

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**Potencial terapéutico de la proteína reguladora SOCS1
en las complicaciones crónicas de la diabetes**

TESIS DOCTORAL
CARLOTA RECIO CRUZ
MADRID, 2016

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA
FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**Potencial terapéutico de la proteína reguladora SOCS1
en las complicaciones crónicas de la diabetes**

TESIS DOCTORAL

**CARLOTA RECIO CRUZ
LICENCIADA EN BIOLOGÍA**

DIRECTORES:

JESÚS EGIDO DE LOS RÍOS Y CARMEN GÓMEZ GUERRERO

**LABORATORIO DE NEFROLOGÍA EXPERIMENTAL Y PATOLOGÍA
VASCULAR. IIS-FUNDACIÓN JIMÉNEZ DÍAZ**

UNIVERSIDAD AUTONÓMA DE MADRID

Don Jesús Egido de los Ríos, Catedrático de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid
y Doña Carmen Gómez Guerrero, Profesora Contratada Doctora,

CERTIFICAN

Que Doña Carlota Recio Cruz, Licenciada en Ciencias Biológicas por la
Universidad Autónoma de Madrid, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado
“Potencial terapéutico de la proteína reguladora SOCS1 en las complicaciones crónicas de la
diabetes” que presenta como Tesis Doctoral para alcanzar el grado de Doctor por la
Universidad Autónoma de Madrid.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 7 de Enero de 2016

Los directores de tesis,

Dr. Jesús Egido de los Ríos

Dra. Carmen Gómez Guerrero

“Cuando creíamos que teníamos todas las respuestas, de pronto, cambiaron todas las preguntas”

Mario Benedetti

"Si tú tienes una manzana, y yo tengo una manzana, e intercambiamos manzanas, entonces tanto tú como yo seguimos teniendo una manzana. Pero si tú tienes una idea, e intercambiamos ideas, entonces ambos tendremos dos ideas"

George Bernard Shaw

“Para tener éxito no tienes que hacer cosas extraordinarias; haz cosas ordinarias extraordinariamente bien”

Anónimo

“No renuncies porque las cosas se pusieron difíciles. Recuerda: si merece la pena, no será fácil”

Anónimo

A mis padres

A mis hermanos

A Diego

AGRADECIMIENTOS

Recuerdo aquel día, en el pasillo de la facultad, cuando vi aquel cartel colgado en el tablón de anuncios. Poco después esperaba, nerviosa, para entrevistarme con la Dra. Carmen Gómez Guerrero, quien me habló de unas proteínas SOCS, de vías de señalización, de la diabetes... y de otras muchas cosas que, sin conocer muy bien, me parecieron apasionantes. Varias semanas después recibí esa esperadísima llamada que me hizo gritar y bailar de ilusión... Han pasado ya cinco años desde entonces, que me han permitido, además de acabar este libro llamado tesis, conocer y aprender de muchas personas que han compartido este camino conmigo.

En primer lugar quiero agradecer al Dr. Egidio la oportunidad de trabajar en su laboratorio. Gracias por contagiar esa pasión por seguir aprendiendo cada día y avanzar con nuestros estudios. Gracias por tutelar mi beca.

A la JEFA. Tengo que darte las gracias por muchas cosas, pero la principal es por ver algo en mí que me ha hecho llegar hasta aquí. Gracias por tu confianza y por tu paciencia. Gracias por hacer del grupo una pequeña familia. Espero que esto sea simplemente un “hasta luego”.

A Beñat, mi maestro. Siempre he creído que los nuevos becarios son en parte producto de quien les enseña. Gracias por tu INMENSA paciencia, por enseñarnos a trabajar cada día con alegría, porque no he conocido a nadie más generoso que tú a la hora de trabajar en equipo, siempre dispuesto a echar una mano... Porque aún pasado tanto tiempo se te sigue echando de menos...Seguiremos siendo las Beñakas forever!

A mi Ainhou, mi media pipeta. Gracias por estos años, en los que hemos sido como siamesas. Gracias por hacer que me guste ir a trabajar cada día porque juntas nos lo pasábamos en grande. Por esos cafés de marujeo que tanto nos gustan. Porque ha llegado un punto en el que no necesitamos ni hablar para entendernos. Esta tesis es tan mía como tuya. Eres, sin duda, lo mejor que me llevo de estos cinco años. Gracias AMIGA.

A Iolanda, por poner un poco de cordura entre nosotras. Gracias por tus consejos y por tu apoyo en esta última etapa. Aunque a veces cueste ver la luz al final del túnel, creo que conseguirás lo que quieres, porque no he conocido a nadie tan constante y trabajador como tú.

A mi Helen, gracias por todas nuestras charlas y risas, por todo lo que hemos compartido dentro y fuera del labo. Gracias por tu vitalidad y por tu cariño. Te pongo un temaso?!

A la Lola. Me ha encantado poder conocerte mucho mejor este último tiempo atrás. Pienso que eres una máquina y vas a llegar muy lejos. Gracias por esos ratillos de charletas y risas. Te veo en un par de añitos! ;)

A mis vecinas preferidas de poyata, Cris y Valva. Qué buenos ratos de risas hemos pasado en nuestras cañitas después del labo... Pero sin duda me quedo con ese viaje a Lyon, porque fue único y especial,

porque nos lo pasamos en grande! Gracias a las dos por tantos buenos momentos y por ser siempre tan cariñosas conmigo. ¡Ese montadito 69 que nos encanta!

A Juanchito, porque cuando nos juntamos nos sale ese toque sureño que los demás no entienden...jejeje. Gracias por alegrarnos las tardes de trabajo con tus chistes, tus videos graciosos... gracias por todos tus consejos, por animarme siempre. Eres la caña.

A Alfons y Ernest. Gracias por esos ratillos de descanso y terapia abajo. También por el ambiente desenfadado y alegre que aportáis al labo, y porque siempre estáis dispuestos a echar una mano. A Cristian por ser tan buena gente! Da gusto con personas como tú. A Juanma, por esa bendita capacidad de sacarme de quicio...en el fondo sabes que te tengo cariño. A Dieguillo, que no me olvido de ti! Te deseo mucha suerte y ánimo con la tesis y que sepas que aunque te meta caña, me pareces un amor de niño. Y a Charlie, por tu disponibilidad y ayuda con nuestras estructuras de bolitas, que han quedado super chulas!!! Gracias.

A Olga, me ha gustado tenerte temporalmente de vecina de al lado. Creo que vales mucho como investigadora pero también como persona. Vas a conseguir lo que te propongas. Ánimo que ya no queda nada!!

A Julio, aunque ya no estás, gracias por tu ayuda, tus consejos científicos, tu disponibilidad siempre que se te pedía ayuda. ¡Sigues siendo una referencia en el labo!

A Jose Luis y Luis, que para mí vais en pack. Lo que más me gusta de vosotros es ver como trabajáis codo con codo, compartiendo ideas y conocimientos siempre acompañados de risas y buen rollo entre los dos. Creo que tenéis mucha suerte de poder compartir algo así. Gracias a los dos por vuestra sabia ayuda. Jose, nunca se me olvidara aquella charleta intensa que mantuvimos en la SEA de Reus; me hizo pensar!

A los del animalario, Pilar, Juani, Carlos y Jose, gracias por toda vuestra ayuda y por hacer más amenos los ratillos en el quirófano.

A Julia, porque te mereces muchísimo lo que has conseguido. Da gusto trabajar con alguien que siempre tiene una sonrisa en la cara. Y a nuestra Carmencita... te echamos de menos!!

A todos los demás, me ha gustado mucho compartir con vosotros estos años. Gracias por hacer del labo un lugar agradable donde trabajar.

A mi grupo de Oxford. Thanks Prof. Greaves to host me in your lab and give me the chance to learn and work in your team. Thanks to everyone in the lab, Asif, Lewis, Theo, Danny, Sophia, Gemma, Max and Jamie for your time and your patience, because you make me feel like at home since first days. It was a wonderful experience to stay last year in Oxford and I hope this second part will be amazing as well!

A Alfonso, mi profe del cole, mi padrino y amigo. Gracias por inculcarme tu pasión por la Biología. Eres el principal responsable de que haya llegado hasta aquí.

A mis dos amigas del alma, María y Sara. Gracias por formar parte de mi vida desde que tengo uso de razón. Por preguntarme cada día por mis experimentos, por mis artículos... por ser mi máximo apoyo. Porque nadie en el mundo me conoce tan bien como vosotras. Porque hemos crecido juntas, y lo seguiremos haciendo sin importar dónde estemos. Gracias por estar SIEMPRE a mi lado.

A mis niños, Ávila, Felipe y Míquel. Por ser mis grandes amigos. Por todo lo que hemos compartido juntos. A Pedrito, mi Bro! Gracias por hacerme la vida fácil y divertida en Oxford. Me encanta haber retomado nuestra amistad, “congelada” en el tiempo. See you very soon!!

A Tere y a Paz, porque me encanta cuánto disfrutamos de nuestros encuentros, de nuestras charlas y de esa manera “revolucionaria” que tenemos de pensar y ver el mundo. Me encanta que las circunstancias nos hayan dado la oportunidad de formar este estupendo trío “lalala”.

A la que sin duda ha sido mi segunda familia durante mis años en Madrid. Lola, Pau y Caye. Mis lindas marripozitaz. Dais alegría a mi vida. Porque los años que hemos vivido juntas han sido únicos e inolvidables. Porque cuando reímos juntas me olvido del resto del mundo.

A Maricarmen, por preocuparte por mí y tratarme siempre con tanto cariño. Eres una luchadora y de las personas más fuertes que conozco.

A mis padrinos, Quique y Almudena. Porque desde que pisé Madrid por primera vez, siempre me habéis cuidado y ayudado. Sois estupendos. Gracias.

A mi abu, mi Benjamin Button. Porque con tus 97 años, sigues transmitiendo una alegría y una fuerza increíbles. Recuerdo aquellas tardes tomándome las lecciones de Ciencias Naturales...

A mis hermanitos, porque sois lo mejor que tengo. Pablo, Jaime y Solita...siempre hablo a todo el mundo de vosotros... porque estoy súper orgullosa de los hermanos que tengo.

Gracias a mis padres. Porque todo lo que soy os lo debo a vosotros. Por todo lo que me habéis enseñado. Porque siempre me habéis apoyado de manera incondicional y siempre habéis confiado en mí. Esta tesis es para vosotros. Gracias mami por guiarme y enseñarme que no hay nada que no pueda conseguir. Os quiero muchísimo.

Y a Diego, mi amor y mi mitad... Gracias por mil millones de cosas. Por todo lo que aprendo de ti cada día. Porque me encanta crecer y soñar a tu lado. Gracias por apoyarme tanto y más en esta próxima aventura que vamos a vivir. Sin ti no lo habría conseguido. Porque juntos formamos el equipo perfecto y me encanta nuestro pequeño mundo feliz en el que vivimos. Te quiero.

Los resultados presentados en esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

- **Recio C**, Oguiza A, Lázaro I, Mallavia B, Egido J, Gómez-Guerrero C. Suppressor of cytokine signaling 1-derived peptide inhibits Janus kinase/signal transducers and activators of transcription pathway and improves inflammation and atherosclerosis in diabetic mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2014 Sep; 34(9):1953-60.
- **Recio C**, Oguiza A, Mallavia B, Lázaro I, Ortiz-Muñoz G, López-Franco O, Egido J, Gómez-Guerrero C. Gene delivery of suppressors of cytokine signaling (SOCS) inhibits inflammation and atherosclerosis development in mice. *Basic Res Cardiol.* 2015 Mar; 110(2):8.
- **Recio C**, Oguiza A, Lázaro I, Mallavia B, Blanco J, Egido J, Gómez-Guerrero C. Impact of SOCS-mimetic peptide on renal inflammation and fibrosis in diabetic mice. *Journal of the American Society of Nephrology* 2015 (enviado).

Otras publicaciones conseguidas durante el desarrollo de esta tesis:

- Asif J Iqbal^{*}, Tessa J Barrett^{*}, Lewis Taylor, Eileen McNeill, Arun Manmadhan, **Carlota Recio**, Alfredo Carmineri, Maximilian H Brodermann, Gemma E White, Dianne Cooper, Joseph A. DiDonato, Stanley L Hazen, Keith M Channon, David R Greaves, Edward A Fisher. Acute exposure to apolipoprotein A1 inhibits macrophage chemotaxis *in vitro* and monocyte recruitment *in vivo*. *Circulation* 2015 (en revisión).
- Lázaro I, Oguiza A, **Recio C**, Mallavia B, Madrigal-Matute J, Blanco J, Egido J, Martín-Vantura JL, Gómez-Guerrero C. Targeting HSP90 ameliorates nephropathy and atherosclerosis through suppression of NF- κ B and STAT signaling pathways in diabetic mice. *Diabetes.* 2015; 64(10):3600-13.
- Oguiza A, **Recio C**, Lázaro I, Mallavia B, Blanco J, Egido J, Gómez-Guerrero C. Peptide-based inhibition of I κ B kinase/nuclear factor- κ B pathway protects against diabetes-associated nephropathy and atherosclerosis in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia.* 2015 Jul; 58(7):1656-67.
- Mallavia B, Oguiza A, López-Franco O, **Recio C**, Ortiz-Muñoz G, Lázaro I, López-Parra V, Egido J, Gómez-Guerrero C. Gene deficiency in activating Fc γ receptors influences the macrophage phenotypic balance and reduces atherosclerosis in mice. *PLoS One.* 2013 Jun 21; 8(6):e66754.
- Mallavia B, **Recio C**, Oguiza A, Ortiz-Muñoz G, Lázaro I, López-Parra V, López-Franco O, Schindler S, Depping R, Egido J, Gómez-Guerrero C. Peptide inhibitor of Nuclear Factor- κ B translocation ameliorates experimental atherosclerosis. *Am J Pathol.* 2013 May; 182(5):1910-21.
- López-Parra V, Mallavia B, López-Franco O, Ortiz-Muñoz G, Oguiza A, **Recio C**, Blanco J, Nimmerjahn F, Egido J, Gómez-Guerrero C. Fc γ receptor deficiency attenuates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2012 Sep; 23(9):1518-27.

La diabetes mellitus es una enfermedad de una gran prevalencia entre la población mundial que desencadena una serie de complicaciones crónicas en los pacientes, lo que conduce a un deterioro de su calidad de vida. Entre estas complicaciones, la aterosclerosis y la nefropatía constituyen la principal causa de morbimortalidad y enfermedad renal crónica en los pacientes diabéticos, ya que actualmente no existen alternativas terapéuticas que frenen eficazmente la aparición de eventos cardiovasculares o la progresión a insuficiencia renal. La aterosclerosis y la nefropatía diabética comparten características similares desde el punto de vista de su patogenia, entre ellas la activación de mecanismos inflamatorios claves en el inicio y progresión del daño tisular. La vía de señalización intracelular JAK/STAT (Janus quinasa/Transductor de la señal y activador de la transcripción) regula un amplio rango de mediadores implicados en procesos de proliferación celular, inflamación y fibrosis, y es un importante mecanismo por el cual la hiperglicemia y la dislipemia contribuyen a la progresión de las complicaciones de la diabetes. Las proteínas SOCS (supresoras de la señal de citoquinas) constituyen uno de los principales mecanismos que regulan la magnitud y duración de la vía JAK/STAT. Este trabajo se ha centrado en el desarrollo de dos abordajes preclínicos basados en la proteína SOCS1, capaces de reducir la activación crónica de la vía JAK/STAT con el fin de prevenir el inicio y la progresión de la aterosclerosis y la nefropatía diabética.

En primer lugar, se investigó el efecto ateroprotector y antiinflamatorio de la inhibición de JAK/STAT, mediante terapia génica con un adenovirus que codifica la proteína SOCS1, en un modelo experimental de aterosclerosis con ratones deficientes en apolipoproteína E (apoE^{-/-}). La expresión del transgen SOCS1 atenuó la activación de STAT1 y STAT3 en aorta, redujo la expresión de sus genes dependientes (citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión y receptores *scavenger*) y previno el desarrollo de aterosclerosis en fases tempranas, frenando también la progresión de las lesiones ateroscleróticas en fases avanzadas del modelo animal. Además, la terapia con SOCS1 promovió un fenotipo de placa más estable, caracterizado por un menor contenido de lípidos, linfocitos T y macrófagos M1 proinflamatorios y por un incremento de macrófagos M2 antiinflamatorios y colágeno. A nivel sistémico, la terapia génica con SOCS1 redujo la expresión de citoquinas de respuesta linfocitaria Th1 y Th17 y el estado de activación de los monocitos circulantes. En experimentos *in vitro*, SOCS1 inhibió la activación de STAT1 y STAT3 y la expresión de genes proinflamatorios en células vasculares y macrófagos estimulados con citoquinas y también redujo la proliferación y la migración celular.

En segundo lugar, desarrollamos un péptido sintético con permeabilidad celular y que contiene la región inhibidora de quinasa (KIR) de la proteína SOCS1 para el tratamiento experimental de la aterosclerosis y la nefropatía asociadas a diabetes en un modelo de diabetes por inyección de estreptozotocina en ratones apoE^{-/-}. La administración del péptido derivado de SOCS1 no afectó a la hiperglicemia ni al perfil lipídico de los animales diabéticos. Sin embargo, este tratamiento mostró un efecto ateroprotector en los ratones diabéticos, de manera que la supresión de la activación de STAT1 y STAT3 en la aorta redujo de forma efectiva el tamaño y extensión de las placas de ateroma tanto en fases iniciales como en fases avanzadas del proceso aterosclerótico. Además, las lesiones ateroscleróticas de los animales tratados con el péptido SOCS1 se caracterizaron por un menor contenido de lípidos, linfocitos T y macrófagos, y un mayor contenido de colágeno y células de músculo liso vascular, parámetros indicativos de estabilización de la placa. Asimismo, el tratamiento redujo la expresión de citoquinas proinflamatorias y el estrés oxidativo en el tejido aórtico. Por otra parte, los estudios en tejido renal demostraron el efecto protector del péptido derivado de SOCS1 en la nefropatía diabética experimental. El tratamiento mejoró significativamente la función renal y las lesiones renales asociadas a diabetes (expansión mesangial, infiltrado leucocitario y fibrosis) y redujo la activación de STAT1 y STAT3 y la expresión de genes proinflamatorios y profibróticos en el riñón diabético. Es de destacar que ninguno de estos efectos se observó en los animales tratados con el péptido mutante, utilizado en estos estudios como control estructural. *In vitro*, el péptido SOCS1 suprimió la activación de STAT y la expresión de sus genes dependientes en células vasculares y renales estimuladas con citoquinas y redujo procesos de proliferación, migración y adhesión celular.

En conclusión, estos estudios demuestran que la inhibición de la vía JAK/STAT basada en la acción de la proteína reguladora SOCS1 suprime la inflamación y retarda la progresión del daño vascular y renal en ratones diabéticos, proporcionando así las bases para el desarrollo de nuevas terapias frente a las complicaciones inflamatorias de la diabetes.

Summary

Diabetes mellitus is a highly prevalent systemic disease worldwide that triggers a series of chronic complications which reduce the quality of life of patients. Among these complications, atherosclerosis and nephropathy are the leading cause of morbidity, mortality and chronic kidney disease in diabetic patients, given that current therapies are unable to effectively stop the occurrence of cardiovascular events or the progression to kidney failure. Furthermore, atherosclerosis and diabetic nephropathy share similar pathological features, including the activation of inflammatory mechanisms that play a crucial role in all stages of tissue damage. The JAK/STAT (Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription) intracellular signaling pathway regulates a broad range of mediators implicated in cell proliferation, inflammation and fibrosis and is an important mechanism whereby hyperglycemia and dyslipidemia contribute to the progression of diabetic complications. Among the mechanisms controlling the activation and duration of JAK/STAT, the suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins are highlighted. This study addresses the preclinical development of two different SOCS1-based therapeutic approaches targeting chronic activation of JAK/STAT to prevent the initiation and progression of atherosclerosis and diabetic nephropathy.

Firstly, we investigated the atheroprotective and antiinflammatory effect of JAK/STAT inhibition by gene therapy with a SOCS1-encoding adenovirus in an experimental model of atherosclerosis in apolipoprotein E deficient mice (apoE^{-/-}). SOCS1 transgene expression in mouse aorta attenuated STAT1 and STAT3 activation and the expression of STAT-dependent genes (cytokines, chemokines, adhesion molecules and scavenger receptors), therefore preventing early development of atherosclerosis and further progression to advanced lesions. Furthermore, SOCS1 gene delivery promoted a more stable plaque phenotype characterized by lower content of lipids, T lymphocytes and proinflammatory M1 macrophages and higher content of antiinflammatory M2 macrophages and collagen. Systemically, SOCS1 gene therapy reduced the expression of Th1 and Th17 cytokines and the activation state of circulating monocytes. *In vitro*, SOCS1 prevented STAT1 and STAT3 activation and proinflammatory gene expression in cytokine-stimulated vascular cells and macrophages, and also reduced cell proliferation and migration.

Secondly, we developed a synthetic cell-permeable peptide containing the kinase inhibitory region (KIR) of SOCS1 as an experimental therapy for diabetes-associated atherosclerosis and nephropathy in streptozotocin-induced diabetic apoE^{-/-} mice. Administration of SOCS1-derived peptide did not affect hyperglycemia and lipid profile in diabetic mice but resulted in atheroprotection. Indeed, SOCS1 peptide therapy suppressed STAT1 and STAT3 activity in mouse aorta and effectively reduced the size and extension of atheroma plaques at both early and advanced stages of atherosclerosis. Furthermore, atherosclerotic lesions of peptide-treated mice exhibited a reduced content of lipids, T lymphocytes and macrophages, and increased collagen and smooth muscle cell content, indicating a more stable plaque phenotype. Likewise, SOCS1 peptide treatment reduced proinflammatory cytokine expression and oxidative stress in the aortic tissue. On the other hand, studies in kidney tissue revealed a protective effect of SOCS1 peptide in experimental diabetic nephropathy, as evidenced by a significant improvement of renal function and renal lesions (mesangial expansion, leukocyte infiltration and fibrosis). Treatment also attenuated STAT1 and STAT3 activation and reduced the expression of proinflammatory and profibrotic genes in diabetic kidneys. It is noteworthy that no significant effects were observed in mice treated with mutant peptide, the structural control. *In vitro*, SOCS1 peptide suppressed STAT activation and STAT-target gene expression in cytokine-stimulated vascular and renal cells, therefore preventing cell proliferation, migration and adhesion.

Collectively, our studies demonstrate that SOCS1-based inhibition of JAK/STAT signaling pathway suppresses inflammation and retards the progression of vascular and renal injury in diabetic mice, thus providing the basis for the development of new therapies against diabetes inflammatory complications.

Relación de abreviaturas que aparecen en el texto. En muchos casos, se ha mantenido la correspondiente abreviatura en inglés debido a su frecuente utilización en el lenguaje científico.

Ab	Anticuerpo
Ad	Adenovirus
AGE	Productos de glicosilación avanzada
ALT	Alanina aminotransferasa
AngII	Angiotensina II
APC	Aloficocianina
ApoE	Apolipoproteína E
Arg	Arginasa
ALT	Alanina aminotransferasa
AST	Aspartato aminotransferasa
BCA	Ácido bicinconínico
BMDM	Macrófagos derivados de médula ósea
BSA	Albúmina de suero bovino
CCL	Ligando de quimioquina con motivo CC
CCR	Receptor de ligando de quimioquina con motivo CC
CIS	Proteína SH2 inducible por citoquinas
CMLV	Célula de músculo liso vascular
Cy7	Cianina 7
DAB	Tetraclorhidrato de 3,3'- diaminobenzidina
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DHE	Dihidroetidina
DPX	Resina acrílica con base de xileno
EEM	Error estándar de la media
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAS	Secuencia activada gamma
GFP	Proteína verde fluorescente
GHbA1c	Hemoglobina glicosilada
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HEK	Células de riñón embrionario humano
HRP	Peroxidasa de rábano
ICAM-1	Molécula de adhesión intercelular-1
IFN γ	Interferón γ
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
JAK	Janus quinasa
KIM-1	Molécula de daño renal-1

Abreviaturas

KIR	Región inhibidora de quinasa
LDL (ox)	Lipoproteína de baja densidad (oxidada)
LPS	Lipopolisacárido bacteriano
MC	Célula mesangial
MCT	Línea de células epiteliales de túbulo renal proximal
MMP	Metaloproteinasas
MTT	1-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-3,5-difenilformazan
MUT	Mutante
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
N.D.	No determinado
NF- κ B	Factor nuclear- κ B
NK	Célula Natural killer
NO	Óxido nítrico
PAS	Ácido periódico de Schiff
PE	Ficoeritrina
Pfu	Unidades formadoras de placa
PKC	Proteína quinasa C
PRR	Peso renal relativo
PVDF	Fluoruro de polivinilideno
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SCr	Creatinina sérica
Ser	Serina
SFB	Suero fetal bovino
SH2	Dominio de homología Src-2
SOCS	Proteína supresora de la señal de citoquinas
STAT	Transductor de la señal y activador de la transcripción
STZ	Estreptozotocina
TFE	Trifluoroetanol
TG	Triglicérido
TGF β	Factor de crecimiento transformante β
Th	Linfocito T cooperador
TNF α	Factor de necrosis tumoral α
Treg	Linfocito T regulador
Tyr	Tirosina
U.a.	Unidades arbitrarias
UAC	Relación albúmina/creatinina en orina
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular-1

I.INTRODUCCIÓN.....	1
1. DIABETES MELLITUS.....	1
2. ATROSCLOSIS.....	2
2.1. Mecanismos implicados en la aterosclerosis.....	4
2.1.1. <i>Hiperglucemia</i>	4
2.1.2. <i>Dislipemia</i>	4
2.1.3. <i>Inflamación, migración y proliferación celular</i>	5
2.1.4. <i>Estrés oxidativo</i>	9
3. NEFROPATÍA DIABÉTICA.....	10
3.1. Mecanismos implicados en la nefropatía diabética.....	12
3.1.1. <i>Hiperglucemia</i>	12
3.1.2. <i>Dislipemia</i>	12
3.1.3. <i>Inflamación</i>	13
3.1.4. <i>Proliferación, hipertrofia y fibrosis</i>	14
4. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR JAK/STAT.....	15
4.1. Regulación de la vía JAK/STAT: proteínas SOCS.....	17
4.2. Implicación del eje JAK/STAT/SOCS en el daño vascular y renal.....	19
II.OBJETIVOS.....	23
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	27
1. PURIFICACIÓN DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES.....	27
2. DISEÑO Y SÍNTESIS DEL PÉPTIDO DERIVADO DE SOCS1.....	28
3. CULTIVOS CELULARES.....	28
3.1. Estímulos	28
3.2. Cultivos primarios.....	28
3.3. Líneas celulares.....	29
3.4. Ensayos de viabilidad y proliferación celular.....	29
3.5. Ensayos de migración y adhesión celular.....	30
4. MODELOS EXPERIMENTALES.....	31
4.1. Animales empleados.....	31
4.2. Modelo experimental de aterosclerosis.....	31
4.3. Modelo experimental de diabetes.....	32
4.4. Procesamiento de los tejidos.....	33
4.5. Análisis bioquímicos.....	33
4.6. Citometría de flujo.....	33
5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO.....	34
5.1. Histología e inmunohistoquímica en aorta.....	34
5.2. Histología e inmunohistoquímica en riñón.....	36
6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS.....	37
6.1. Extracción de proteínas totales.....	37
6.2. Western blot.....	37
6.3. Inmunocitofluorescencia.....	38

6.4. Ensayo de gen reportero.....	38
6.5. ELISA.....	39
7. ANÁLISIS DE RNA.....	39
7.1. Extracción de RNA.....	39
7.2. PCR cuantitativa a tiempo real.....	39
8. MEDIDA DE ESTRÉS OXIDATIVO.....	40
8.1. Detección de ROS por fluorescencia.....	40
8.2. Actividad NADPH oxidasa.....	41
9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41
IV. RESULTADOS.....	45
1. LA TERAPIA GÉNICA CON LA PROTEÍNA REGULADORA SOCS1 COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA EN LA ATROSCLEROSIS.....	45
1.1. EFECTO <i>IN VITRO</i> DEL ADENOVIRUS SOCS1.....	45
1.1.1. <i>Inhibición de la activación de STAT mediada por adenovirus SOCS1.....</i>	45
1.1.2. <i>Regulación de mediadores inflamatorios por el adenovirus de SOCS1.....</i>	46
1.1.3. <i>Impacto del adenovirus SOCS1 en la proliferación y migración celular.....</i>	48
1.2. ACCIONES <i>IN VIVO</i> DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ADENOVIRUS SOCS1 EN LA ATROSCLEROSIS EXPERIMENTAL.....	49
1.2.1. <i>Transferencia del gen SOCS1 en ratones ateroscleróticos.....</i>	49
1.2.2. <i>La administración del gen SOCS1 inhibe la activación de STAT y reduce la aterosclerosis en el modelo experimental.....</i>	50
1.2.3. <i>Alteraciones en la composición de la placa aterosclerótica de los ratones tratados con adenovirus SOCS1.....</i>	54
1.2.4. <i>La sobreexpresión de SOCS1 reduce la inflamación vascular y sistémica en los ratones ateroscleróticos.....</i>	56
2. DESARROLLO DE UN PÉPTIDO MIMÉTICO DE LA PROTEÍNA SOCS1 PARA EL TRATAMIENTO DE LAS COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA DIABETES.....	60
2.1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL PÉPTIDO DERIVADO DE SOCS1.....	60
2.2. EFECTOS <i>IN VITRO</i> DEL PÉPTIDO SOCS1.....	61
2.2.1. <i>Inhibición de la activación de STAT por el péptido SOCS1.....</i>	61
2.2.2. <i>El péptido SOCS1 inhibe la expresión de genes de inflamación y fibrosis dependientes de la vía JAK/STAT.....</i>	64
2.2.3. <i>Inhibición de la migración y proliferación celular por el péptido SOCS1.....</i>	66
2.2.4. <i>El péptido SOCS1 regula la adhesión y polarización de macrófagos.....</i>	68
2.2.5. <i>El péptido SOCS1 regula los niveles de ROS en células del vaso.....</i>	69
2.3. EFECTOS <i>IN VIVO</i> DEL PÉPTIDO SOCS1 EN LA ATROSCLEROSIS Y LA NEFROPATÍA ASOCIADAS A DIABETES.....	72
2.3.1. <i>Distribución del péptido SOCS1 en los tejidos.....</i>	72
2.3.2. <i>Evolución del modelo de diabetes experimental en ratones apoE^{-/-}.....</i>	73
2.3.3. <i>El tratamiento con el péptido SOCS1 bloquea la activación de JAK/STAT en las placas ateroscleróticas de ratones diabéticos.....</i>	75

2.3.4. El péptido SOCS1 limita el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis en los ratones diabéticos.....	75
2.3.5. El tratamiento con el péptido SOCS1 altera la composición de las placas de ateroma.....	77
2.3.6. El péptido SOCS1 reduce el estrés oxidativo intravascular en la diabetes.....	79
2.3.7. El tratamiento con el péptido SOCS1 bloquea la activación de la vía JAK/STAT en los riñones de ratones diabéticos.....	81
2.3.8. El péptido SOCS1 atenúa el daño renal inducido por diabetes.....	82
2.3.9. El péptido SOCS1 frena la fibrosis renal en los ratones diabéticos.....	85
2.3.10. Impacto del tratamiento con el péptido SOCS1 en la inflamación renal.....	86
2.3.11. La activación de la vía JAK/STAT como marcador de daño renal en la nefropatía diabética.....	88
2.3.12. Efecto del tratamiento con el péptido mimético de SOCS1 en la inflamación sistémica.....	90
V. DISCUSIÓN.....	93
1. LA TERAPIA GÉNICA CON LA PROTEÍNA REGULADORA SOCS1 COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA EN LA ATEROSCLEROSIS.....	95
2. DESARROLLO DE UN PÉPTIDO MIMÉTICO DE LA PROTEÍNA SOCS1 PARA EL TRATAMIENTO DE LAS COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA DIABETES.....	98
VI. CONCLUSIONES/CONCLUSIONS.....	111
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	117
VIII. ANEXOS.....	135

I. Introducción

1. DIABETES MELLITUS

La diabetes mellitus es una alteración metabólica que se caracteriza por un estado de hiperglucemia persistente o crónico debido principalmente a un defecto en la secreción de insulina por las células β del páncreas, o por su uso inadecuado por parte del organismo. Esto va acompañado de alteraciones en el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y lípidos. La severidad de los síntomas depende del tipo y la duración de la diabetes. La clasificación más aceptada de los distintos tipos de diabetes, propuesta por la Asociación Americana de Diabetes en 1997, distingue entre tipo 1 (consistente en la destrucción autoinmune de células β del páncreas y deficiencia absoluta de insulina), tipo 2 (deficiencia y resistencia relativa a insulina), otros tipos (como enfermedad pancreática) y, por último, diabetes gestacional¹. Según la Organización Mundial de la Salud, la diabetes se está convirtiendo en una epidemia mundial; de 171 millones de personas diabéticas en el mundo en el año 2000, la cifra ha ascendido a 370 millones en 2014, y se estima que siga aumentando. Según las últimas proyecciones de la Federación Internacional de Diabetes, una de cada diez personas será diabética en el año 2050^{2, 3}. Dada su elevada frecuencia en la población, la diabetes se ha convertido en una de las enfermedades con mayor impacto socio-sanitario, debido además a las complicaciones agudas y crónicas que causa. Entre los problemas agudos que desencadena la diabetes, los más frecuentes son la hipoglucemia, el estado hiperosmolar hiperglicémico y la cetoacidosis diabética, causados principalmente por una descompensación (déficit o exceso total o relativo) en la cantidad de insulina presente en el organismo⁴. Entre las complicaciones crónicas de la diabetes se incluyen las microvasculares (retinopatía, neuropatía y nefropatía) y las macrovasculares (enfermedad cardíaca, cerebrovascular y enfermedad vascular periférica), responsables de una reducción importante en la calidad de vida del paciente y del 50-80% de las muertes de los enfermos diabéticos (**Figura 1**). Además, la diabetes es la causa más común de insuficiencia renal crónica y entrada de los pacientes en programas de diálisis y trasplante³⁻⁵. En el presente trabajo nos hemos centrado en el estudio del daño vascular (aterosclerosis) y renal (nefropatía) asociados a diabetes, dos complicaciones frecuentes de los pacientes diabéticos y que, desde el punto de vista de su patogenia comparten características similares, entre ellas la activación de la respuesta inflamatoria, un proceso clave en el inicio y progresión del daño tisular causado por el entorno diabético.

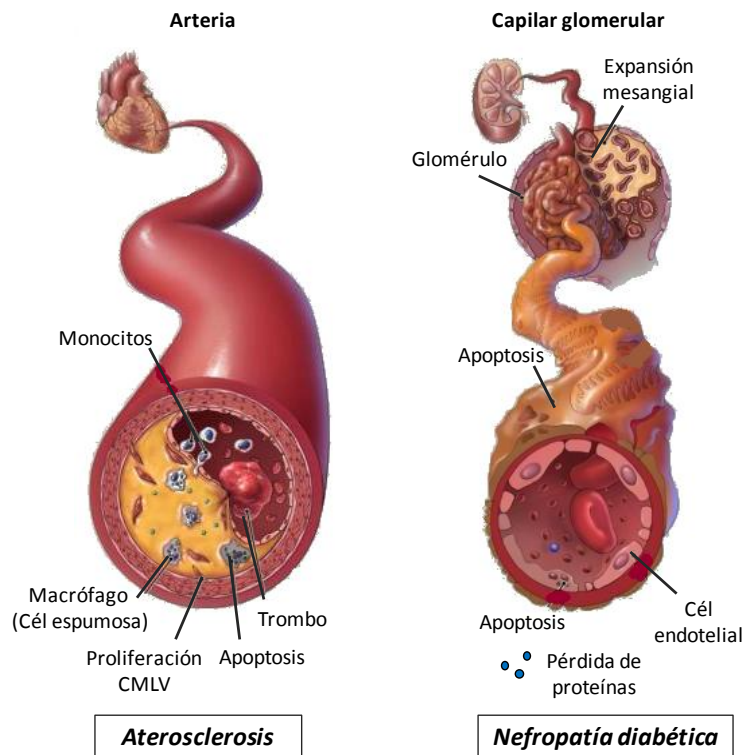


Figura 1. Cambios histopatológicos durante el desarrollo de aterosclerosis y nefropatía en la diabetes. Modificado de Rask-Madsen *et al.*⁵.

2. ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis constituye una de las principales complicaciones macrovasculares de la diabetes y es una de las primeras causas de muerte en los países occidentales⁶. Esta enfermedad crónica afecta principalmente a las arterias de gran calibre y se caracteriza por la formación en la pared del vaso de una lesión o placa de ateroma, constituida por acumulación de lípidos y leucocitos infiltrados desde la sangre y una capa formada mayoritariamente por colágeno y producida por las células de músculo liso vascular (CMLV)^{7, 8}. Su origen reside en la suma de diversos participantes, como las células de la pared arterial, los componentes de la sangre y las interacciones moleculares que se producen entre ellos⁹.

Una arteria sana está formada por tres capas concéntricas. La capa más interna o íntima, compuesta por células endoteliales, lámina basal y tejido conectivo subendotelial laxo, es la encargada del contacto con el medio interno, el torrente sanguíneo. A continuación la túnica media, formada por varias capas concéntricas de CMLV metabólicamente muy activos y responsables de la síntesis de la matriz extracelular. Por último, la capa externa o túnica adventicia, compuesta principalmente de colágeno y elastina, por la que circulan los vasos sanguíneos propios (*vasa vasorum*) que irrigan a los vasos sanguíneos de gran calibre como la aorta, y en la que se encuentran las fibras nerviosas del vaso¹⁰ (**Figura 2**).

En la formación de la placa de ateroma participan distintos tipos celulares, entre los que se incluyen las **células endoteliales**, cuya disfunción se traduce en una mayor atracción de células inflamatorias hacia el interior de la placa; los **macrófagos**, con un papel importante en la inflamación a través de la secreción de citoquinas, concentran en su interior lípidos oxidados para convertirse en células espumosas¹¹; y las **CMLV** de la capa media arterial, fundamentales a la hora de mantener la integridad de los vasos en condiciones fisiológicas, ya que producen colágeno y otros componentes de la matriz extracelular. Además, en un entorno inflamatorio, las CMLV sufren cambios fenotípicos de manera que pasan de un fenotipo contráctil a uno secretor¹².

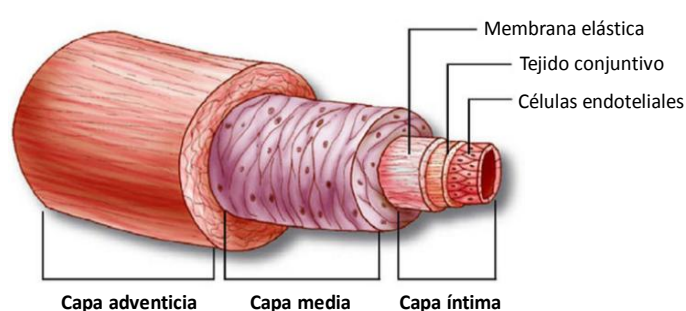


Figura 2. Estructura general de la pared arterial. Esquema de las capas que forman la pared.

Durante la progresión de la enfermedad aterosclerótica, la placa de ateroma inicialmente formada se va endureciendo y la luz del vaso se reduce, limitando el flujo de sangre rica en oxígeno hacia los órganos. La placa, en su desarrollo, puede evolucionar hacia un fenotipo de placa estable, rica en matriz extracelular y CMLV y generalmente asintomática, o por el contrario hacia un tipo de placa vulnerable, con abundantes macrófagos y células espumosas y presencia de una capa fibrosa (matriz extracelular compuesta de colágeno y elastina) más débil y propensa a la rotura⁶. Las consecuencias clínicas más significativas ocurren cuando la cápsula fibrosa se rompe y el núcleo trombogénico del interior de la lesión entra en inevitable contacto con las proteínas coagulantes de la sangre circulante, formándose un trombo que, al ser liberado, puede dar lugar a diferentes efectos patológicos como infarto de miocardio, ictus cerebral o tromboembolismo venoso¹³.

Aunque clásicamente se ha considerado una patología asociada a la acumulación de lípidos, actualmente la aterosclerosis se entiende como una enfermedad inflamatoria crónica, ya que numerosas evidencias demuestran que la inflamación juega un papel fundamental en todo el proceso aterosclerótico, desde su inicio hasta sus complicaciones trombóticas⁶.

Determinadas condiciones o hábitos pueden aumentar las probabilidades de desarrollar aterosclerosis. Los factores de riesgo más importantes son: hipercolesterolemia e hipertrigliceridemia; resistencia a la insulina y diabetes; inflamación; hipertensión; hábitos de vida (tabaco, falta de actividad física, sobrepeso, dieta no saludable, estrés y alcohol); edad y antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular¹⁴.

2.1. Mecanismos implicados en la Aterosclerosis

2.1.1. Hiperglucemia

Numerosos estudios en pacientes diabéticos y modelos animales han demostrado que la hiperglucemia tiene un importante papel proaterogénico, ya que la glucosa elevada altera la función del endotelio arterial, promoviendo la adhesión de leucocitos a las células endoteliales en las etapas iniciales del proceso aterosclerótico¹⁵. La hiperglucemia crónica también induce cambios epigenéticos (p. ej. metilación y acetilación) en el promotor de genes prooxidantes y proinflamatorios en las células endoteliales¹⁶ y además promueve la formación de productos de glicosilación avanzada (AGE) los cuales, al interaccionar con sus receptores presentes en las células del endotelio activan la expresión de moléculas de adhesión¹⁷. También se activa la ruta de la proteína quinasa C (PKC), lo que disminuye la óxido nítrico (NO) sintasa y aumenta la expresión de factores inflamatorios. Los niveles elevados de glucosa también inducen cambios fenotípicos en las CMLV, que pasan de un estado quiescente y contráctil a uno proliferativo, con mayor capacidad migratoria y expresión de genes inflamatorios¹⁸.

2.1.2. Dislipemia

La dislipemia consiste en una alteración en el metabolismo de lípidos, principalmente colesterol y triglicéridos. Los pacientes diabéticos presentan un elevado riesgo de desarrollar dislipemias¹⁹. Esto se debe, principalmente, a que en la diabetes existe un aumento en la liberación de ácidos grasos libres por parte de las células adiposas resistentes a insulina. Los niveles elevados de ácidos grasos libres promueven la síntesis de triglicéridos que, a su vez, inducen la secreción de apolipoproteína (apo) B y colesterol unido a lipoproteínas de baja densidad (LDL), cuyo exceso (hipercolesterolemia) se relaciona estrechamente con un aumento del riesgo cardiovascular^{20, 21}.

Una etapa clave en el inicio y desarrollo de la aterosclerosis es la acumulación y modificación en el espacio subendotelial de LDL. Estas partículas contienen colesterol esterificado y triglicéridos rodeados por una capa compuesta de fosfolípidos, colesterol libre y apo-B100⁷.

Cuando la concentración de partículas LDL en plasma es elevada, éstas atraviesan el endotelio y se depositan en la capa íntima de los vasos, donde son modificadas por procesos de oxidación (originando LDL oxidadas (LDLox)), glicosilación o agregación de aldehídos. Esto induce la activación de las células residentes del vaso, principalmente endoteliales, que expresan en su membrana proteínas de adhesión celular y selectinas, favoreciendo la unión de los leucocitos circulantes a la superficie endotelial y su infiltración en la capa íntima vascular, donde se diferencian y se activan^{22, 23}. La mayoría de los monocitos atraídos a la zona de la lesión se diferencian a macrófagos o células dendríticas por efecto del factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF)²⁴. Los macrófagos activados liberan mediadores y expresan niveles elevados de receptores *scavenger* (CD204 y CD36, principalmente) encargados de la captación de LDLox, transformándose así en células espumosas cargadas de lípidos¹¹. Esta acumulación excesiva de lípidos genera células apoptóticas y lípidos trombogénicos y favorece la secreción de mediadores inflamatorios en el lugar de la lesión^{25, 26} (**Figura 3**).

2.1.3. Inflamación, migración y proliferación celular

La inflamación juega un papel clave en el desarrollo de la aterosclerosis, desde sus inicios hasta etapas avanzadas de la enfermedad. De hecho, uno de los primeros pasos en la formación de la placa aterosclerótica es el engrosamiento de la capa íntima denominada “neoíntima”, que se produce por la acumulación de células espumosas y por la proliferación y migración de CMLV en esta zona de la pared arterial¹². Los macrófagos producen gran cantidad de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas que, por un lado, atraen más leucocitos circulantes, y por otro, inducen el remodelado vascular por las CMLV. Además las CMLV activadas y las células espumosas secretan gran cantidad de mediadores proinflamatorios que aceleran el reclutamiento de más leucocitos, generándose un bucle de inflamación crónica en el lugar de la lesión que agrava el proceso aterosclerótico (**Figura 3**).

Durante este curso inflamatorio, los **macrófagos** presentes en la lesión pueden polarizarse hacia varios fenotipos con distinta funcionalidad. Se han descrito dos fenotipos principales: los macrófagos activados clásicamente o M1 (inflamatorios) y los macrófagos activados de forma alternativa o M2 (reparadores)^{27, 28}. Los macrófagos M1 se polarizan en un ambiente inflamatorio (p.ej. interferón γ (IFN γ) y endotoxinas bacterianas) y se caracterizan por la expresión de CD86 y la producción de NO y citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral α (TNF α), y las interleuquinas 1 y 6 (IL-1, IL-6)²⁹. Por su parte, los macrófagos M2 se polarizan con las citoquinas antiinflamatorias IL-4 e IL-10 y se caracterizan

por la expresión del receptor de manosa y por participar en la resolución de la inflamación y en la reparación tisular²⁸. También se ha demostrado que las dos isoformas de la enzima arginasa, la arginasa I citoplasmática (ArgI) y la arginasa II mitocondrial (ArgII) son marcadores de macrófagos M2 y M1, respectivamente³⁰.

Además de su papel en la respuesta inflamatoria, los macrófagos son células clave en la progresión de la aterosclerosis, ya que influyen en la estabilidad de la placa, bien provocando una disminución en la síntesis de proteínas de matriz extracelular (colágeno, fibronectina, elastina y laminina), bien favoreciendo su degradación mediante la expresión incrementada de las metaloproteinasas (MMP)³¹. De hecho, varios estudios han mostrado que existe una correlación significativa entre la presencia de macrófagos en regiones del hombro de la placa propensas a rotura, el engrosamiento de la capa fibrosa en estas regiones y la acumulación de MMP activadas^{31, 32}.

Por otra parte, en el proceso inflamatorio durante la formación de la placa participan otros tipos celulares. Entre ellos, las **células dendríticas**, que pueden derivar de los monocitos atraídos a la zona de la lesión o ser capaces de migrar e infiltrarse diferenciadas desde los tejidos linfáticos. En la lesión aterosclerótica, estas células se localizan en la capa íntima y son las principales presentadoras de antígenos a los linfocitos T no diferenciados³³. Otros componentes celulares de las lesiones son los linfocitos, encargados de producir la respuesta inmune adaptativa que, a diferencia de la respuesta innata llevada a cabo por los macrófagos y otros fagocitos, es capaz de reconocer específicamente millones de antígenos y producir una respuesta específica frente a ellos. Entre los diferentes tipos de **linfocitos T**, en las placas ateroscleróticas se han encontrado los cooperadores (Th), los reguladores (Treg) y los citotóxicos³⁴. En el grupo de los linfocitos T cooperadores se diferencian los subtipos Th1, Th2 y Th17. Los dos primeros inducen cambios fenotípicos y funcionales en otros leucocitos de la respuesta inmune. Por ejemplo, las citoquinas de la respuesta Th1 dirigen la diferenciación de macrófagos a M1 y las citoquinas liberadas por las células Th2 favorecen el fenotipo M2^{35, 36}. Por su parte, la respuesta Treg es antiinflamatoria y reduce la inflamación vascular³⁷. Por último, los **linfocitos B**, responsables de la respuesta inmune humoral, son las principales células secretoras de anticuerpos (Ab) en la lesión y requieren de ciertas señales por parte de los linfocitos Th para su activación. Se ha sugerido que, en función de la población de linfocitos B activada, estas células pueden desarrollar una función ateroprotectora (mediada por la síntesis de inmunoglobulinas M (IgM)) o por el contrario, aterogénica (a través de la formación de inmunocomplejos IgG-LDLox)^{38, 39}.

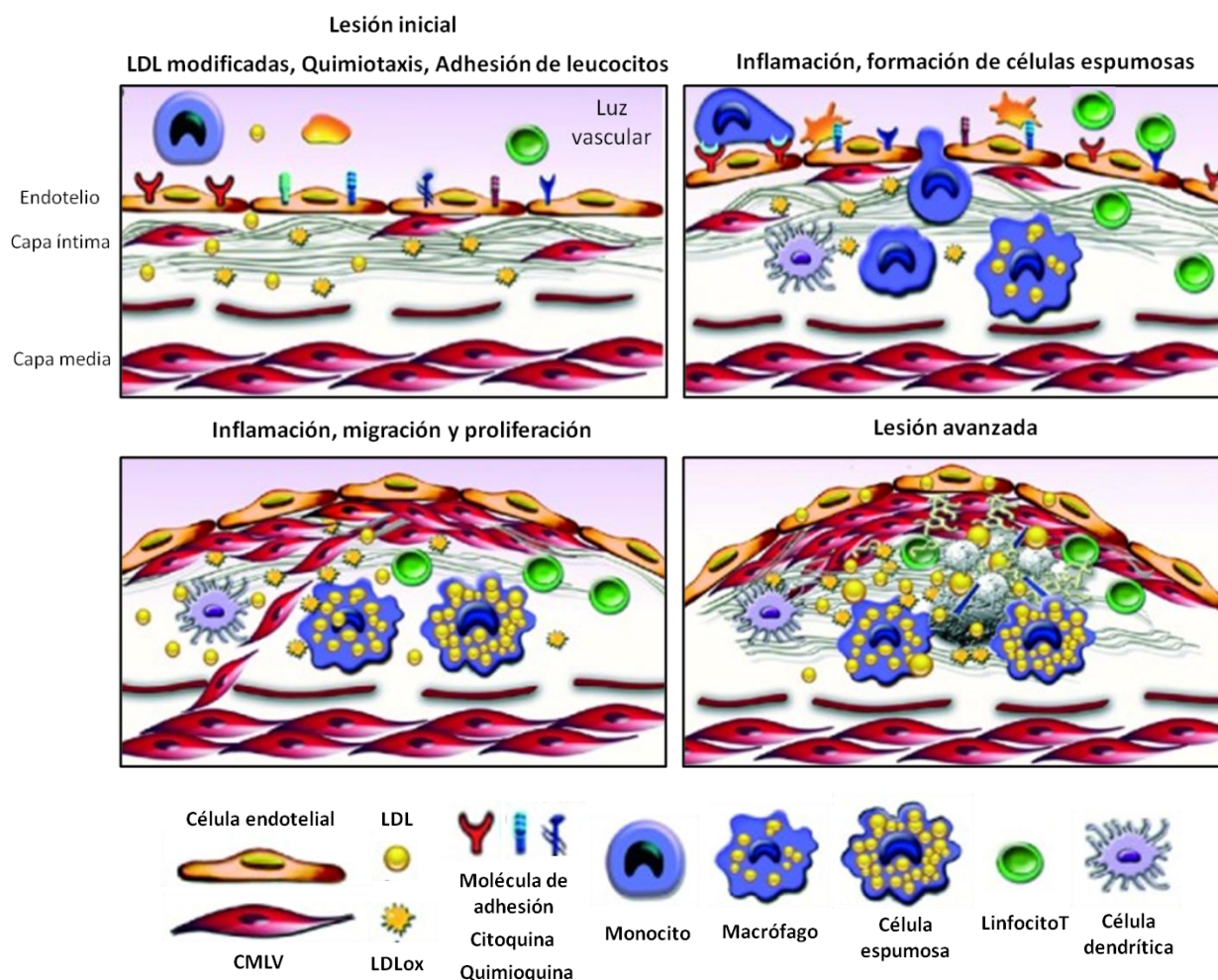


Figura 3. Mecanismos y mediadores implicados en la formación de la lesión aterosclerótica. Modificado de Manduteanu *et al.*²².

Entre los mediadores inflamatorios que juegan un papel importante en el desarrollo del proceso aterosclerótico destacan las moléculas de adhesión, las citoquinas y las quimioquinas. Las **moléculas de adhesión** intracelular-1 (ICAM-1) y vascular-1 (VCAM-1) y la E-selectina son proteínas involucradas en la unión entre células o con la matriz extracelular y favorecen la adhesión e infiltración de los monocitos y linfocitos T circulantes al endotelio inflamado, así como la migración y proliferación de CMLV²⁵. Concretamente, ICAM-1, mediante interacción con otras moléculas de adhesión llamadas integrinas, interviene en el frenado de velocidad de los leucocitos en el torrente sanguíneo y su posterior adhesión a las células del endotelio, permitiendo su posterior infiltrado a la capa íntima del vaso. Su expresión es inducida por diversas citoquinas, principalmente IL-1 y TNF α . La expresión de

estas moléculas de adhesión se ha visto aumentada en lesiones ateroscleróticas humanas y de ratón⁴⁰.

Las **citoquinas** son proteínas que regulan procesos de activación, proliferación y migración celular a través de sus receptores de membrana. Existen varias clases: IL, TNF, CSF, factor de crecimiento transformante (TGF) y quimioquinas. Las citoquinas desempeñan un papel clave en la regulación de la respuesta inmunoinflamatoria, ya que controlan la inmunidad innata y adaptativa⁴¹. Según su actividad, las citoquinas pueden clasificarse en proinflamatorias (p.ej. TNF α , IFN γ , IL-1, IL-6, IL-12 e IL-18) o antiinflamatorias (p.ej. IL-10, IL-13 y TGF β)⁴². En este trabajo tienen especial protagonismo las citoquinas IL-6 e IFN γ , responsables de mediar importantes procesos en la enfermedad aterosclerótica, a través de la activación de vías de señalización intracelular⁴³. IFN γ es sintetizado por células *natural killer* (NK) y células T, entre otras, y su deficiencia génica en ratones se asocia con una reducción en el tamaño de la lesión aterosclerótica⁴³. Por su parte, IL-6 puede ser sintetizada por macrófagos, células endoteliales y CMLV, y sus niveles en plasma se han encontrado aumentados en pacientes con enfermedad cardiovascular⁴⁴. Sin embargo, el papel de IL-6 en inflamación es ambivalente, ya que puede ejercer funciones proinflamatorias o antiinflamatorias según el contexto en que se encuentre.

Las **quimioquinas** son pequeñas citoquinas quimiotácticas que estimulan la migración dirigida de leucocitos y participan en procesos de angiogénesis, desarrollo embrionario y homeostasis celular, así como en la patogénesis de muchas enfermedades inflamatorias y autoinmunes⁴⁵. Dentro de esta familia se distinguen cuatro subfamilias, en función de la disposición de sus dos primeros residuos de cisteína: C (p. ej. XCL1 y XCL2), CC (p. ej. CCL2 y CCL5), CXC (p. ej. IL-8 y CX3C) y CX₃C (p. ej. CX₃CL1). Entre ellas destaca la proteína quimioattractante de monocitos CCL2, que tiene un amplio espectro de actividad y potente capacidad quimiotáctica para monocitos y linfocitos T, es producida por células residentes del vaso, monocitos/macrófagos y linfocitos T⁴⁶ y ejerce su función a través del receptor CCR2. Otra quimioquina importante es CCL5, capaz de atraer células T, eosinófilos, basófilos y monocitos/macrófagos, desarrollando un papel clave en el reclutamiento de leucocitos a la lesión y en la potenciación de la inflamación crónica⁴⁵. Diversos estudios han demostrado un incremento en los niveles de expresión de CCL2 y CCL5 en células del endotelio vascular, CMLV y macrófagos tanto *in vitro* como en placas ateroscleróticas humanas^{47, 48}. Además, la inhibición de ambas quimioquinas es capaz de reducir las lesiones ateroscleróticas en modelos experimentales⁴⁹.

2.1.4. Estrés oxidativo

El estrés oxidativo es el resultado de un desequilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS; que incluyen los radicales libres y los peróxidos) y los sistemas antioxidantes de la célula. Estos desajustes del estado normal redox causan efectos tóxicos que dañan a todos los componentes de la célula, incluyendo proteínas, lípidos y DNA⁵⁰. En la vasculatura, las ROS participan en la peroxidación de lípidos de la pared vascular, induciendo la liberación de numerosos mediadores inflamatorios tales como citoquinas, quimioquinas, moléculas de adhesión, factores de crecimiento y MMP⁵⁰⁻⁵².

Numerosos estudios han resaltado la importancia del estrés oxidativo en todos los estadios del proceso aterosclerótico^{50,53}. Por ejemplo, la generación de ROS induce procesos celulares asociados con la formación de la placa aterosclerótica tales como migración, proliferación, diferenciación y apoptosis de las CMLV^{54,55}. La enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) oxidasa representa la principal fuente de estrés oxidativo en la vasculatura⁵⁶. NADPH oxidasa cataliza la reacción de oxidación $\text{NAD(P)H} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{O}_2^{\bullet-} + \text{NAD(P)}^+ + \text{H}^+$, en la que se genera anión superóxido. Presente en células endoteliales, CMLV, fibroblastos y monocitos/macrófagos, este sistema enzimático juega un papel fundamental en el desarrollo de enfermedades cardiovasculares en humanos⁵⁷. El sistema enzimático es una familia de multienzimas asociadas a la membrana que consta de 7 miembros (Nox1, Nox2, Nox3, Nox4, Nox5 y Duox1-2). Según el tipo celular, el complejo enzimático se compone de distintas subunidades^{56,58}. En fagocitos, la estructura clásica consta de una subunidad catalítica (Nox2) y dos subunidades citosólicas (p67phox, p47phox), mientras que Nox1 y Nox4 son las isoformas catalíticas predominantes en CMLV⁵⁹. Además, Nox1 forma un complejo con dos subunidades citosólicas, NoxO1 (organizadora) y NoxA1 (activadora), homólogas respectivas de p47phox y p67phox^{60, 61} (**Figura 4**). En todos los casos, la subunidad transmembrana p22phox es esencial para el funcionamiento de la enzima. El complejo también requiere la interacción con la proteína de unión a GTP Rac1/2.

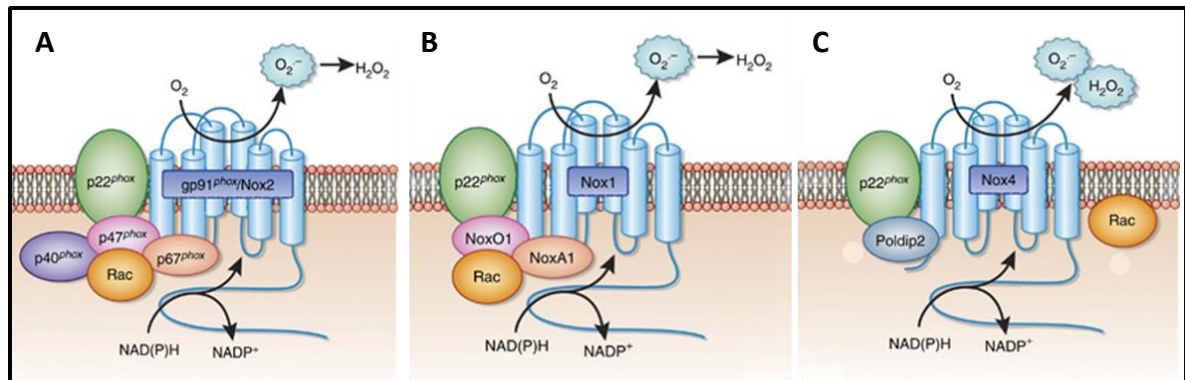


Figura 4. Estructura y organización molecular de las principales isoformas NADPH oxidasas vasculares. (A) Nox2, (B) Nox1 y (C) Nox4. H₂O₂, peróxido de hidrógeno; O₂^{•-}, anión superóxido. Modificado de Bedard *et al.*⁶² y Brandes *et al.*⁵⁵.

3. NEFROPATÍA DIABÉTICA

Una importante complicación microvascular de la diabetes mellitus es la nefropatía, principal causa de enfermedad renal terminal en el mundo y responsable de la entrada en programas de trasplante y diálisis de un elevado número de pacientes diabéticos^{4, 63}. Se estima que en la actualidad entre un 30-40% de los enfermos diabéticos desarrolla nefropatía⁶⁴.

El riñón es el órgano encargado de la filtración de la sangre, eliminando los productos tóxicos del metabolismo a través de la orina. La unidad estructural y funcional del riñón es la nefrona. El riñón humano contiene aproximadamente un millón de nefronas, cada una de las cuales está formada por una región globosa llamada Corpúsculo de Malpighi que contiene los glomérulos (rodeados por una capa delgada de revestimiento endotelial llamada cápsula de Bowman), el túbulo contorneado proximal, los segmentos delgado y grueso del asa de Henle (forma de U) y el túbulo contorneado distal, que desemboca en un túbulo colector (**Figura 5**).

En el glomérulo se pueden diferenciar varios tipos celulares (endoteliales, mesangiales, epiteliales y macrófagos residentes), una pared capilar que constituye la membrana basal y una región intersticial que representa la matriz mesangial. Las células mesangiales (MC) proporcionan soporte estructural, participan en la filtración glomerular y el aclaramiento de macromoléculas, tienen capacidad fagocítica, sintetizan mediadores inflamatorios y están implicadas en la generación y degradación de proteínas de matriz extracelular^{65, 66}. Por su parte, las células tubuloepiteliales se localizan en la corteza renal formando el espacio

tubulointersticial y regulan la entrada y salida de solutos del túbulo en el proceso de formación de la orina.

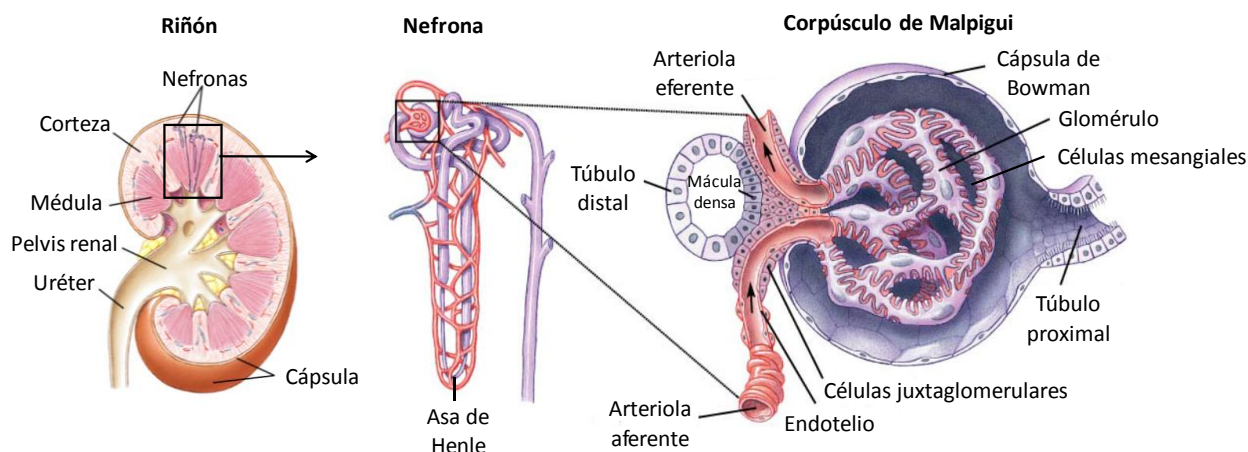


Figura 5. Estructura del riñón. Corte esquemático del riñón que representa la morfología general del órgano. Se muestra en detalle la estructura de la nefrona y el glomérulo.

Desde el punto de vista estructural, la nefropatía diabética se caracteriza por cambios en el riñón que incluyen la hipertrofia glomerular y el engrosamiento de las membranas glomerular, tubular y basal por acumulación de matriz extracelular, lo que causa finalmente fibrosis y esclerosis glomerular y tubulointersticial⁶⁷. A nivel funcional, se produce pérdida de la tasa de filtración glomerular y excreción urinaria de albúmina en cantidades patológicas, conocida como microalbuminuria (albuminuria persistente a niveles de 30-299 mg/24 horas) en las fases iniciales y como macroalbuminuria (albuminuria persistente ≥ 300 mg/24 horas) en etapas más avanzadas⁶⁸.

El tratamiento actual de la nefropatía diabética está centrado en controlar la presión sanguínea, reducir la proteinuria y retardar por tanto la pérdida de función renal, para lo que se utilizan generalmente inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina o bloqueantes de los receptores tipo 1 de angiotensina II (AngII)⁶⁹. Sin embargo, estas terapias no consiguen frenar la progresión final de la enfermedad en un buen número de pacientes, por lo que es necesario, además del estricto control de los niveles de glucosa y lípidos (reducción del peso corporal) el uso de otros fármacos, como antidiabéticos (incretinas), estatinas o incluso nuevas terapias más específicas contra la nefropatía diabética.

3.1. Mecanismos implicados en la Nefropatía diabética

Entre los mecanismos que contribuyen a la patogenia de la nefropatía diabética destacan la interacción entre los cambios metabólicos y hemodinámicos inducidos por la hiperglucemia y la predisposición genética como causas principales⁷⁰. Sin embargo, estudios recientes han demostrado el importante papel que desempeña la respuesta inmunoinflamatoria en el inicio y progresión de la enfermedad^{71, 72}.

3.1.1. Hiperglucemia

La hiperglucemia es la causa principal por la que la nefropatía diabética progresa a enfermedad renal terminal. La elevada glucosa altera diversas rutas metabólicas en las células renales y activa numerosos mediadores (p. ej. TGF β , CCL2 y fibronectina) involucrados en procesos de inflamación y fibrosis⁶⁷. Además provoca una acumulación excesiva de sorbitol en la ruta del poliol, causando un aumento de AGE, estrés oxidativo y activación de PKC, lo que conduce finalmente al incremento del volumen mesangial y al engrosamiento de la membrana basal⁷³. La hiperglucemia también es responsable del daño del endotelio renal ya que provoca, vía PKC, un descenso de la NO sintasa, aumentando la expresión de factores fibrogénicos e inflamatorios⁷³. Por último, los cambios hemodinámicos asociados a hiperglucemia producen un aumento en la presión sistémica e intraglomerular mediado por diversos factores vasoactivos como AngII, NO y el factor de crecimiento del endotelio vascular.

3.1.2. Dislipemia

Existen varios mecanismos por los que la dislipemia podría conducir a nefropatía diabética. Así, las lipoproteínas ricas en triglicéridos estimulan, a través de la expresión del factor de crecimiento TGF β , la producción de ROS y el aumento de proteínas de matriz extracelular. También activan los monocitos y afectan al glucocáliz celular, causando un aumento de la permeabilidad glomerular. Las LDLox inhiben la vasodilatación mediada por NO y promueven la proliferación mesangial y la expresión de factores quimiotácticos de monocitos, contribuyendo así al daño glomerular⁷⁴. Estos efectos adversos pueden ser revertidos por las HDL; de hecho, los niveles bajos de HDL se asocian con un agravamiento del daño renal en pacientes con nefropatía diabética⁷⁵. Estudios en modelos experimentales han demostrado también que la hiperlipidemia *per se* contribuye al desarrollo de lesiones renales tempranas⁷⁶.

3.1.3. Inflamación

Cada vez más evidencias destacan el papel clave que desempeña la inflamación en la patogenia de la nefropatía diabética. Desde las fases tempranas de la enfermedad se produce acumulación de macrófagos y células T en el glomérulo y el espacio tubulointersticial. Estos leucocitos adheridos al endotelio a través de selectinas producen moléculas proinflamatorias (citoquinas, quimioquinas y moléculas de adhesión) que promueven el reclutamiento de nuevas células y la activación de las células residentes, que a su vez sintetizan factores implicados en la migración leucocitaria, la proliferación de células renales y la producción de matriz extracelular. De esta manera se inicia un círculo vicioso de amplificación del proceso inflamatorio que agrava y perpetúa el daño renal inicial^{71, 77, 78}. Recientes observaciones experimentales y clínicas en muestras de sujetos diabéticos han puesto de manifiesto que las interacciones de los macrófagos y linfocitos T con las células residentes renales desempeñan un papel relevante en el desarrollo del daño renal asociado a diabetes. Así, la acumulación de macrófagos en los riñones de pacientes y animales diabéticos se correlaciona con la severidad del daño glomerular y tubulointersticial⁶⁷. Por otra parte, en pacientes con diabetes tipo I se ha asociado la aparición de nefropatía con un aumento en la activación de linfocitos T periféricos y su detección en la biopsia renal⁷⁹.

A continuación se exponen algunos de los principales mediadores inflamatorios que participan en el desarrollo de la nefropatía diabética.

Las **moléculas de adhesión** ICAM-1 y VCAM-1 dirigen la adhesión de leucocitos al endotelio renal. Diversos estudios han mostrado que ratones deficientes en ICAM-1 son resistentes a desarrollar nefropatía diabética, mientras que el tratamiento con Ab monoclonales frente a ICAM-1 previene el infiltrado glomerular de leucocitos⁸⁰.

Entre las diversas **citoquinas** inflamatorias implicadas en el daño renal asociado a diabetes destaca TNF α , producida por monocitos, macrófagos y células T y también por las células residentes renales. Estudios experimentales han relacionado el aumento de TNF α en células glomerulares y tubulares de ratas diabéticas con la hipertrofia y la hiperfuncionalidad renal, dos alteraciones de la etapa inicial de la nefropatía diabética⁷⁷. Otras citoquinas, como IFN γ e IL-6, también participan en la patogénesis del daño renal y sus niveles se han visto aumentados en riñones y en orina de los pacientes^{81,82}. Diversos estímulos promueven la síntesis de IL-6 en macrófagos, células endoteliales, CMLV y fibroblastos, siendo su principal función la proliferación y diferenciación de células mesangiales^{83,84}. Asimismo, el IFN γ

sintetizado principalmente por células NK y linfocitos T participa activamente en procesos de inflamación y fibrosis tanto en fases iniciales como avanzadas de la nefropatía diabética⁷⁷.

Entre los factores quimiotácticos, destacan las **quimioquinas** CCL2 y CCL5, cuya expresión se ha visto incrementada en células glomerulares y tubuloepiteliales en cultivo, así como en el tejido renal y la orina de pacientes y animales diabéticos en correlación con el infiltrado inflamatorio y el daño renal^{90,91}.

3.1.4. Proliferación, hipertrofia y fibrosis

Además de la respuesta inflamatoria, en el desarrollo de la nefropatía diabética tiene lugar un proceso de fibrosis renal crónica caracterizado por la acumulación en glomérulos y tubulointersticio de proteínas de matriz extracelular (p. ej. fibronectina y colágenos tipo I, III y IV), debida tanto a un incremento en la síntesis como a una menor degradación por parte de las MMP^{92,93}. Las principales células efectoras responsables del depósito excesivo de matriz extracelular son las células mesangiales, las tubuloepiteliales y los fibroblastos intersticiales. El factor de transcripción TGF β es una molécula clave en la fibrosis renal, ya que induce la síntesis de proteínas de matriz extracelular y disminuye su degradación por las MMP⁸⁵, y además promueve la transición epitelio-mesénquima (formación de miofibroblastos productores de matriz extracelular)^{86,87}. En pacientes y animales con nefropatía diabética se han detectado niveles elevados de TGF β , tanto en orina como en tejido renal^{88,89}. Además, el tratamiento con Ab anti-TGF β mejoró la fibrosis y la función renal en animales diabéticos⁴.

Por otra parte, las numerosas citoquinas y factores de crecimiento generados por el entorno diabético promueven diversos cambios en el glomérulo, como la proliferación, migración e hipertrofia de células mesangiales y el engrosamiento de la membrana basal glomerular. Esto provoca una expansión del glomérulo que disminuye el volumen luminal de los capilares y por tanto la filtración, causando lesiones críticas que conducen a insuficiencia renal. A su vez, en el compartimento tubulointersticial se induce la proliferación e hipertrofia de las células tubulares y el engrosamiento de la membrana basal tubular^{94,95}. Todos estos cambios se asocian con las principales complicaciones renales características de esta enfermedad: hiperfiltración glomerular y microalbuminuria⁹⁶.

4. LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN INTRACELULAR JAK/STAT

Numerosos estudios han identificado las diferentes vías de señalización y los factores de transcripción que regulan la expresión de genes implicados en los procesos patológicos asociados a las complicaciones diabéticas. Este trabajo se ha centrado en el estudio de la vía de señalización intracelular JAK/STAT (del inglés, Janus kinase/Signal transducer and activator of transcription).

La vía JAK/STAT es un mecanismo intracelular esencial de citoquinas, pero también de moléculas proaterogénicas y otros factores activados por la diabetes, que regula la expresión de múltiples genes implicados en proliferación, diferenciación celular e inflamación⁹⁷. Constituye la conexión entre los receptores de la superficie celular y la activación de la maquinaria transcripcional en el núcleo^{98,99}. El sistema está constituido por la tirosina quinasa JAK, el factor de transcripción STAT y diversas proteínas reguladoras. En presencia de estímulos externos de citoquinas, en la célula se produce la unión del ligando a su receptor transmembrana, de forma que las proteínas JAK asociadas al receptor (dos o más) se ponen en estrecha proximidad a través de la oligomerización del receptor, promoviendo su autofosforilación y/o transfosforilación. Una vez activada, JAK fosforila residuos de tirosina en la región citoplasmática de los receptores para crear sitios de reconocimiento SH2 (dominio de homología Src-2) para miembros de la familia STAT. Las proteínas STAT unidas al receptor son entonces fosforiladas por JAK, lo que favorece su dimerización y posterior translocación al núcleo, donde inician la transcripción de los genes diana (**Figura 6**)¹⁰⁰.

La familia JAK está formada por cuatro proteínas de 120-130 kDa (JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2), que contienen una región N-terminal de unión al receptor y dos dominios con actividad quinasa separados por una pequeña región bisagra¹⁰¹. Por su parte, la familia STAT consta de siete miembros (STAT1, STAT2, STAT3, STAT4, STAT5A, STAT5B y STAT6) que comparten regiones de alta homología, incluyendo un dominio N-terminal, un dominio espiral, un dominio de unión al DNA, un dominio SH2 y un dominio de transactivación en el extremo C-terminal¹⁰² (**Figura 6**). Este último contiene dos residuos aminoacídicos (Tyr701 y Ser727 en STAT1; Tyr705 y Ser727 en STAT3) cruciales para la actividad de la proteína STAT, de manera que la fosforilación en tirosina por JAK promueve la dimerización de STAT, mientras que la fosforilación en serina por parte de la familia de quinasas activadas por mitógenos aumenta su activación transcripcional^{102, 103}.

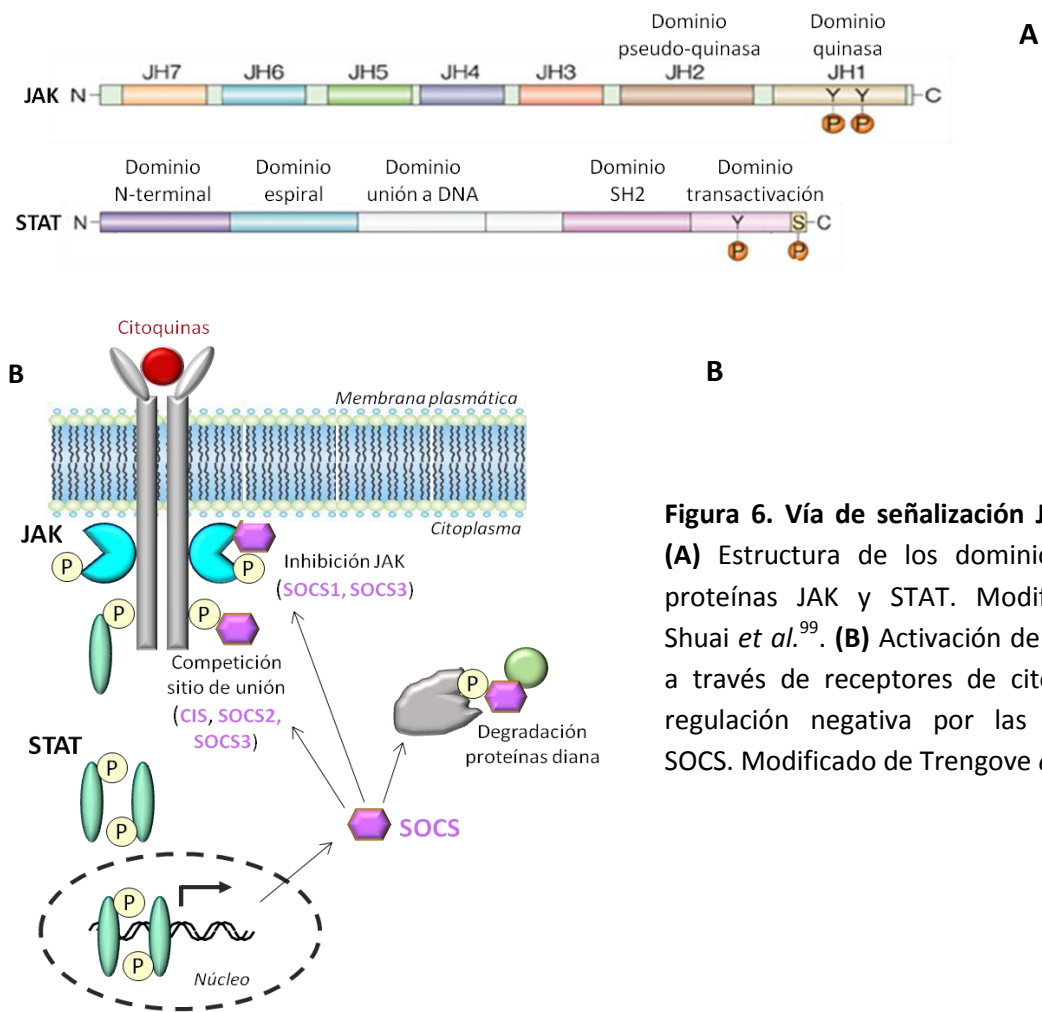


Figura 6. Vía de señalización JAK/STAT. (A) Estructura de los dominios de las proteínas JAK y STAT. Modificado de Shuai *et al.*⁹⁹. (B) Activación de JAK/STAT a través de receptores de citoquinas y regulación negativa por las proteínas SOCS. Modificado de Trengove *et al.*¹⁰⁴.

Las proteínas STAT se encuentran de forma latente en el citoplasma y su fosforilación promueve la formación de homodímeros (STAT1, STAT3, STAT4, STAT5A y STAT5B) o heterodímeros (STAT1-STAT2 y STAT1-STAT3) a través de su dominio SH2. Después, los dímeros activos se translocan rápidamente al núcleo, donde se unen a la secuencia GAS (secuencia activada gamma) del DNA, activando la expresión génica de quimioquinas (CCL2, CCL5, IL-8 y CXCL10), moléculas de adhesión (VCAM-1 e ICAM-1), proteínas de matriz (colágeno IV) y genes de respuesta temprana (c-fos y c-jun), entre otros^{105,106}. A veces, los dímeros de STAT pueden interactuar con otros factores para formar complejos capaces de reconocer otros elementos de unión al DNA, como ISRE (elemento de respuesta estimulado por IFN)^{101,107}. En general, STAT1 y STAT2 transducen señales de IFN (α , β , γ); STAT3 es activado por IL-6, IL-10, el factor de crecimiento epidérmico y el factor de crecimiento derivado de plaquetas; STAT4, STAT5A y STAT5B transducen la señal del receptor de IL-12; mientras que STAT6 es importante para la señalización de IL-4 e IL-13⁹⁹ (**Tabla 1**).

Ligando	JAK	STAT	Genes que activa	Respuesta celular
IFN γ	JAK1, JAK2	STAT1	SOCS, CCL2, CCL5, ICAM-1, CXCL10, TNF, Fc γ RI.	Inflamación, apoptosis, respuesta Th1, diferenciación
IFN α/β	JAK1, TYK2	STAT1, STAT2	SOCS, OAS2	Respuesta antiviral, diferenciación
IL-6, IL-10, IL-23, Leptina	JAK1, JAK2, TYK2	STAT3	SOCS, ICAM-1, TGF β , IL-17, MMP, Bcl-XL, VEGF.	Angiogénesis, proliferación y supervivencia, respuesta Th17, fibrosis
IL-12	JAK2, TYK2	STAT4	SOCS, IFN γ .	Proliferación, respuesta Th1, fibrosis
IL-2, IL-7, Hormona crecimiento, Prolactina	JAK1, JAK2, JAK3	STAT5	SOCS, TGF β , IL-10, IL-4, Bcl-XL.	Proliferación y supervivencia, respuesta Treg
IL-4, IL-13	JAK1, JAK3, TYK2	STAT6	SOCS, GATA3.	Respuesta Th2, fibrosis

Tabla 1. Resumen de los principales activadores, genes dependientes y respuestas celulares inducidas por la vía JAK/STAT. Fc γ R1, receptor Fc γ tipo1; OAS2, oligoadenilato sintetasa envuelta en la respuesta inmune innata; Bcl-XL, proteína de supervivencia, del inglés B-cell lymphoma-extra large; GATA3, factor de transcripción de unión al DNA que regula el desarrollo de linfocitos T.

Además de su clásica activación a través de receptores de citoquinas, la vía JAK/STAT también puede asociarse a receptores de AngII, quimioquinas, lipoproteínas, glucosa, AGE, insulina o inmunoglobulinas^{108, 109}. En este sentido, estudios previos de nuestro grupo demuestran que la activación de JAK2, STAT1 y STAT3 participa en las respuestas de las células vasculares y renales inducidas por la hiperglucemia o tras estimulación con agentes inflamatorios y aterogénicos^{97, 110, 111}.

4.1. Regulación de la vía JAK/STAT: proteínas SOCS

Dado el papel clave que JAK/STAT desempeña en la señalización de citoquinas y otros mediadores implicados en las enfermedades inflamatorias, muchos estudios han puesto de manifiesto la importancia de regular la duración y magnitud de esta vía intracelular para prevenir el daño en los tejidos.

Entre los mecanismos clásicos de regulación de la ruta JAK/STAT se incluyen: la internalización del receptor; la desfosforilación por tirosina fosfatasas tanto del receptor como de la proteína JAK; las proteínas inhibidoras de STAT activado, que pueden interferir de forma directa en la unión de STAT al DNA o de forma indirecta inhibiendo la dimerización de STAT^{99, 100}; y las proteínas **SOCS** (del inglés Suppressors of cytokine signaling), los reguladores más estudiados¹¹².

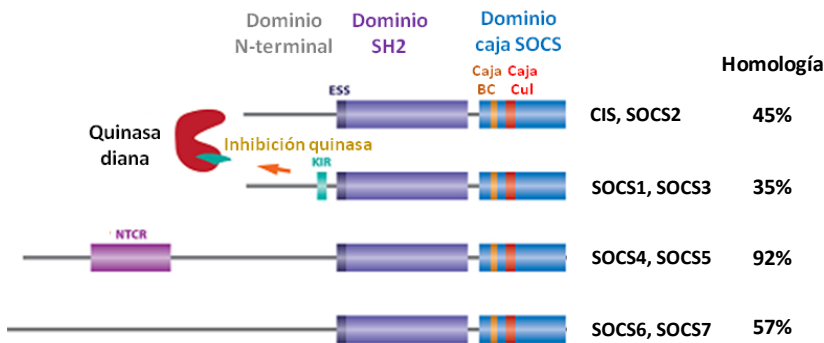


Figura 7. Relación estructural de la familia de proteínas SOCS. Modificado de Trengove *et al.*¹⁰⁴.

SOCS es una familia de pequeñas proteínas (20-30 kDa) inducibles por citoquinas que inhiben la señal de transducción mediante bloqueo de la activación y fosforilación de JAK y STAT, creando un circuito de retroalimentación negativa¹¹³ (**Figura 6**). Se han descrito ocho miembros de la familia (SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7 y la proteína SH2 inducible por citoquinas (CIS)) que presentan diferentes grados de homología y varios dominios estructurales¹¹⁴ (**Figura 7**). En primer lugar, un dominio N-terminal poco conservado de longitud variable. A continuación, un dominio central Src de homología llamado SH2, que contiene una secuencia SH2 extendida (ESS), mediante el cual la proteína SOCS se une a residuos de tirosina fosforilados de los receptores de citoquinas (en el caso de SOCS3 y CIS) o a estos mismos residuos de las proteínas JAK (SOCS1) para el control de la señalización de la vía^{104, 115, 116}. Por último, un dominio C-terminal más conservado llamado caja SOCS, que se asocia con las proteínas elonginas B y C y culina^{99, 112}. Numerosos estudios sugieren que las proteínas SOCS, a través de la caja SOCS, funcionan como moléculas adaptadoras que enlazan dominios de unión de sustratos específicos con la E3 ubiquitin ligasa, favoreciendo así la ubiquitinación y consiguiente degradación proteasomal de determinadas proteínas de señalización celular^{117, 118}. Además de estos dominios, las proteínas SOCS1 y SOCS3 presentan una región denominada **KIR** (región inhibidora de quinasa) implicada en la unión con JAK y en la inhibición de su actividad catalítica¹¹⁴ (**Figura 7**).

Por tanto, la familia SOCS puede inhibir las señales de citoquinas bien uniéndose al sitio catalítico de JAK, bien compitiendo con STAT por los sitios de unión al receptor, o bien activando su degradación proteosomal⁹⁹.

Diversos estudios en modelos experimentales han demostrado el papel crucial de las proteínas SOCS en la fisiopatología, siendo SOCS1 y SOCS3 los miembros de la familia más estudiados en términos de su capacidad reguladora de la señalización por citoquinas. En la **Tabla 2**, se muestran algunos ejemplos de las numerosas estrategias que se han utilizado con modelos de animales *knockout* y transgénicos para determinar el papel individual de los miembros de la familia SOCS en diversas patologías.

SOCS	Knockout		Transgénico
	Tipo	Fenotipo	Fenotipo
SOCS1	SOCS1 ^{-/-} completo	Muerte neonatal, linfopenia, infiltrado de monocitos en los órganos, inflamación sistémica	Activación espontánea de Linf.T, desarrollo defectuoso de Linf.T.
	SOCS1 ^{-/-} + IFN γ ^{-/-}	Riñón poliquístico, lesiones inflamatorias crónicas, desarrollo anómalo de Linf.T.	N.D.
SOCS2	SOCS2 ^{-/-} completo	Gigantismo	Gigantismo
SOCS3	SOCS3 ^{-/-} completo	Muerte embrionaria.	Muerte embrionaria, anemia.
	SOCS3 ^{-/-} hematopoyético	Condiciones inflamatorias, neutrofilia.	N.D.
SOCS4	N.D.	N.D.	N.D.
SOCS5	SOCS5 ^{-/-} completo	N.D.	Reducción en la diferenciación Th2.
SOCS6	SOCS6 ^{-/-} completo	Retardo moderado del crecimiento.	Metabolismo de la glucosa aumentado.
SOCS7	SOCS7 ^{-/-} completo	Homeostasis de la glucosa alterada, retardo del crecimiento.	N.D.
CIS	N.D.	N.D.	Respuesta Linf.T alterada, retardo en el crecimiento

Tabla 2. Resumen de las principales funciones individuales de las proteínas SOCS en diferentes modelos animales. Modificado de Trengove *et al.*¹⁰⁴. N.D., no determinado.

Además de las vías de activación/inhibición bien conocidas para citoquinas, como los ejes IFN γ /STAT1/SOCS1 e IL-6/STAT3/SOCS3, las proteínas SOCS regulan las señales activadas por otros estímulos, entre ellos quimioquinas, insulina, glucosa, factores de crecimiento, inmunocomplejos, LPS, AngII y LDL^{106, 119-122}, lo que demuestra el amplio rango de acción de este mecanismo inhibidor.

4.2. Implicación del eje JAK/STAT/SOCS en el daño vascular y renal

Numerosos estudios han descrito el papel clave de la vía JAK/STAT en diversas enfermedades inflamatorias tales como artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Crohn y encefalomiелitis, así como en cáncer y diabetes, donde regula procesos de proliferación, diferenciación y migración celular^{123,124,125}. JAK/STAT también está implicada en la patogenia

de las enfermedades cardiovasculares, ya que controla una gran cantidad de genes implicados en el reclutamiento leucocitario, la migración y proliferación de CMLV, la formación de células espumosas y la apoptosis. Se han encontrado isoformas de JAK y STAT en las regiones inflamatorias de placas ateroscleróticas humanas y en modelos experimentales de aterosclerosis¹²⁶⁻¹²⁸. En ratones, la deficiencia (total o específica de célula) en los genes de STAT1 y STAT3 previene el desarrollo de placas ateroscleróticas, mientras que la terapia con inhibidores de JAK2 (AG490), STAT1 (fludarabina) y STAT3 (atiprimod) o con plásmidos de expresión de SOCS, reduce el tamaño de la lesión y la hiperplasia neointimal^{97, 129, 130}.

Asimismo, diversos estudios genéticos por *microarrays* en biopsias renales de pacientes diabéticos han identificado componentes de la vía JAK/STAT que están aumentados en los glomérulos durante la fase temprana de la enfermedad y en las áreas tubulares en estadios más avanzados¹³¹. En modelos animales y experimentos *in vitro* se ha demostrado que la activación de JAK1, JAK2, STAT1 y STAT3 por la diabetes participa en la glomeruloesclerosis y la fibrosis intersticial^{108, 131, 132}. Además, fármacos clásicos como los inhibidores del sistema renina-angiotensina o las estatinas previenen la activación de esta vía en animales diabéticos^{131, 133}. Diversos inhibidores específicos de JAK1/JAK2 (baricitinib), JAK2 (AG-490), JAK3 (Janex-1) y STAT1 (fludarabina) también se han propuesto como posibles agentes antidiabéticos por su efecto renoprotector⁶⁹.

Varios estudios han demostrado que la inflamación aguda o crónica altera la expresión de proteínas de la familia SOCS¹⁰⁶. Particularmente, SOCS1 y SOCS3 se han relacionado con una variedad de factores proinflamatorios y proaterogénicos. Su expresión se ha descrito en placas de ateroma humanas⁹⁷ y en muestras renales de pacientes y animales diabéticos¹¹⁰, actuando como un mecanismo compensatorio, pero no suficiente, para suprimir el daño en los tejidos. De hecho, diversas estrategias basadas en el papel regulador de las proteínas SOCS para disminuir la actividad patológica de JAK/STAT, han resultado ser efectivas en modelos experimentales de inflamación aguda y crónica^{104,134}, así como en diabetes^{110,135,136} y aterosclerosis^{97, 137}. Por tanto, la posibilidad de una terapia basada en las proteínas SOCS para abordar las complicaciones vasculares y renales de la diabetes, resulta de potencial interés.

II. Objetivos

Las complicaciones crónicas de la diabetes son la principal causa del deterioro en la calidad de vida e incluso de la muerte de los pacientes. Dos de estas complicaciones, la aterosclerosis y la nefropatía diabética comparten características similares desde el punto de vista de su patogenia, entre ellas la activación de mecanismos inflamatorios clave en el inicio y progresión del daño tisular. La vía JAK/STAT participa en diversas enfermedades inflamatorias, metabólicas y cardiovasculares, ya que regula la expresión de genes implicados en procesos de proliferación, diferenciación y migración celular. Por ello, se ha considerado que el control de la magnitud y la duración de la activación de esta vía intracelular debe ser esencial para prevenir el daño en los tejidos. Basados en esto, nuestra **hipótesis** considera que la modulación de la vía JAK/STAT mediante la familia de proteínas endógenas SOCS, podría ser una potencial diana terapéutica en las complicaciones de la diabetes. Por tanto, el **objetivo global** de este trabajo es el desarrollo de nuevos abordajes preclínicos basados en la proteína SOCS1 para reducir la activación crónica de JAK/STAT y así prevenir el desarrollo de aterosclerosis y nefropatía.

Los objetivos específicos planteados fueron los siguientes:

Objetivo 1. La terapia génica con la proteína reguladora SOCS1 como alternativa terapéutica en la aterosclerosis.

- 1.1. Analizar *in vitro* el efecto de la transfección génica con un adenovirus que codifica para la proteína SOCS1 en las respuestas de células vasculares y monocitos mediadas por la vía JAK/STAT.
- 1.2. Investigar las propiedades antiinflamatorias y ateroprotectoras de la terapia génica con adenovirus de SOCS1 en un modelo murino de aterosclerosis.

Objetivo 2. Desarrollo de un péptido mimético de la proteína SOCS1 para el tratamiento de las complicaciones crónicas de la diabetes.

- 2.1. Estudiar *in vitro* el efecto inhibitor del péptido derivado de la región KIR de SOCS1 en las respuestas de células vasculares y renales mediadas por la vía JAK/STAT.
- 2.2. Explorar *in vivo* el efecto ateroprotector, antiinflamatorio y antioxidante del tratamiento con el péptido derivado de SOCS1 en un modelo experimental de diabetes tipo I asociada a hipercolesterolemia.
- 2.3. Evaluar las consecuencias de la terapia con el péptido SOCS1 en la inflamación y la fibrosis renal durante el inicio y progresión de la nefropatía diabética experimental.

III. Material y métodos

1. PURIFICACIÓN DE ADENOVIRUS RECOMBINANTES

El adenovirus de primera generación regulado por el promotor del citomegalovirus y que contiene el gen SOCS1 de ratón (Ad-S1) se construyó con el sistema de vector AdEasyTM (Qbiogene). Brevemente, el cDNA de SOCS1 de ratón se escindió del vector p513HA (con las enzimas de restricción NdeI y BamHI) y se insertó en el vector de transferencia pShuttle-CMV. El plásmido resultante se linearizó con PmeI y se cotransformó en bacterias junto con el plásmido pAdEasy-1 (serotipo Ad5 y doble delección E1-E3). La construcción del adenovirus recombinante se unió con PacI y se transfectó a las células empaquetadoras HEK 293 (riñón embrionario humano) para producir partículas virales. Así, estas células se convirtieron en productoras del virus portador del gen de interés. Una vez aparecieron síntomas de citotoxicidad vírica, las células se recogieron y lisaron mediante ciclos de congelación/descongelación para la posterior extracción del adenovirus, empleando una membrana de intercambio iónico que absorbe selectivamente las partículas virales (AdEasyTM Virus Purification Kit; Cultek). Como vectores control se utilizaron el adenovirus vacío (Ad-vacío) y el adenovirus que expresa la proteína verde fluorescente (Ad-GFP).

Para la titulación de los adenovirus purificados se utilizó el kit Adeno-XTM Rapid Titer kit (BD Biosciences-Clontech), el cual permite titular únicamente los viriones (partículas virales completas que son infectivas). Se sembraron células HEK 293 en placas de 24 pocillos y se realizaron infecciones con diluciones seriadas (10^{-2} - 10^{-7}) de los adenovirus recombinantes (Ad-S1 o Ad-vacío). Tras 48 horas de infección con el virus, las células se fijaron durante 10 minutos a -20°C en metanol frío, se lavaron y se incubaron durante 90 minutos con un Ab frente a la cápside vírica (Anti-Hexón, diluido 1/1000 en PBS-1% albúmina de suero bovino (BSA)). Seguidamente, se incubaron las células con IgG de rata conjugada con peroxidasa (HRP) en PBS-1% BSA. La detección del Ab se determinó utilizando DAB (tetraclorhidrato de 3,3'-diaminobenzidina; Dako) como cromógeno. La concentración de los virus infectivos se determinó tras conteo en el microscopio, aplicando la siguiente fórmula para calcular la cantidad de unidades formadoras de placa (pfu) por mL:

$$\text{pfu/mL} = \frac{(\text{Células positivas/n}^{\circ}\text{ campos}) \times (\text{n}^{\circ}\text{ campos totales en pocillo})}{\text{Volumen de virus con el que infectamos} \times \text{Factor de dilución}}$$

2. DISEÑO Y SÍNTESIS DEL PÉPTIDO DERIVADO DE SOCS1

Se diseñó un péptido de 16 aminoácidos derivado de la región inhibidora de kinasa (KIR) de la proteína SOCS1 murina, con el dominio implicado en la inhibición selectiva de la vía JAK/STAT mediante bloqueo de la actividad catalítica de JAK2. La secuencia inhibidora se acopló a un residuo hidrofóbico (lisina-palmitato) en la región N-terminal, lo que le confiere capacidad de atravesar la membrana celular. Como control estructural se utilizó un péptido mutado (MUT) con dos sustituciones (F → A) en la secuencia (**Figura 8**). Para los estudios de localización, se empleó una secuencia marcada con la sonda fluorescente rodamina. Los péptidos se sintetizaron mediante el método Fmoc en fase sólida, se purificaron por HPLC y se analizaron por espectrofotometría de masas (Proteogenix) y por dicroísmo circular (espectrofotómetro Jasco 715, Easton, MD, USA)¹³⁸. Los péptidos liofilizados se disolvieron en 1% DMSO y después en solución salina hasta la concentración de 2 µg/mL, se esterilizaron por filtración y se conservaron a -80°C bajo atmósfera de N₂.

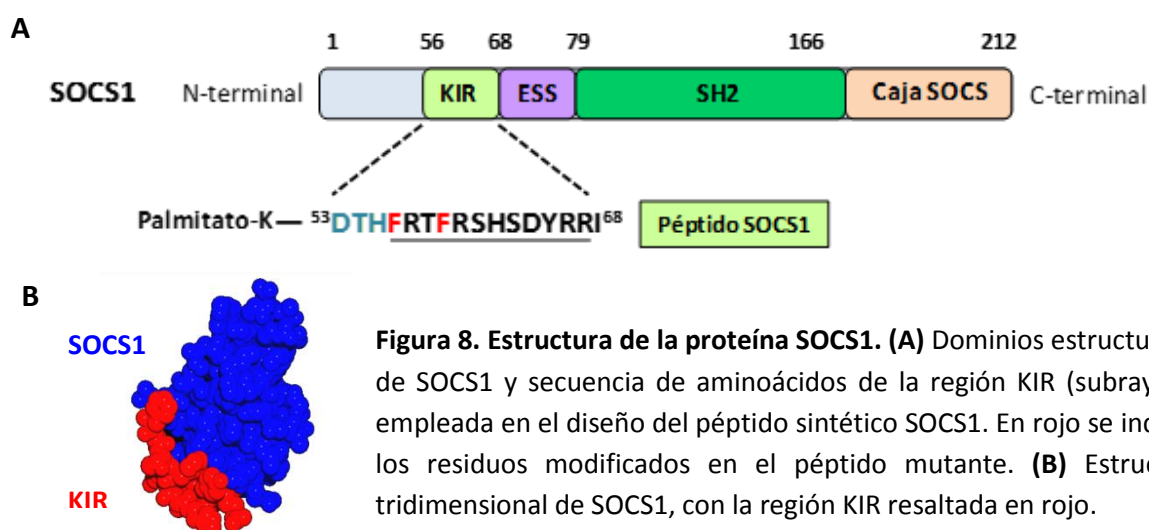


Figura 8. Estructura de la proteína SOCS1. (A) Dominios estructurales de SOCS1 y secuencia de aminoácidos de la región KIR (subrayada) empleada en el diseño del péptido sintético SOCS1. En rojo se indican los residuos modificados en el péptido mutante. **(B)** Estructura tridimensional de SOCS1, con la región KIR resaltada en rojo.

3. CULTIVOS CELULARES

3.1. Estímulos

Los diferentes tipos celulares empleados en este estudio fueron estimulados con citoquinas recombinantes murinas (IFN γ (10³ U/mL) e IL-6 (10² U/mL) proporcionados por Peprotech.

3.2. Cultivos primarios

Las CMLV se obtuvieron a partir de aortas de ratones de fenotipo salvaje de 12-16 semanas de edad. Tras el sacrificio de los ratones previamente anestesiados, se extrajeron las aortas y

se eliminó la grasa y el tejido conectivo adherido. Los vasos troceados en piezas de 1 mm se incubaron durante 45 minutos a 37°C con 4 mg/mL de colagenasa tipo II (290 U/mg; Sigma) resuspendida en medio DMEM (Lonza) suplementado con 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina. Tras varios lavados, las células resuspendidas en DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB) se sembraron en frascos de cultivo de 25 mm² y se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% CO₂, reemplazando el medio cada 2-3 días. Las células se usaron entre el tercer y el séptimo pase.

La obtención de macrófagos peritoneales de ratones de fenotipo salvaje anestesiados se realizó mediante lavado de la cavidad peritoneal con solución salina fría. Las células (1x10⁷ células/pocillo) se sembraron en placas de 6 pocillos (Corning) y tras 2 horas de incubación y sucesivos lavados, se procesaron las células adheridas.

Los macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) se obtuvieron de ratones de fenotipo salvaje de 12-16 semanas de edad. Tras el sacrificio, se extrajo la médula del fémur y la suspensión celular se sembró en placas de cultivo con medio DMEM suplementado con 10% SFB, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina y 100 µg/mL estreptomicina. Las células se diferenciaron durante 7 días en DMEM conteniendo 10% de medio condicionado de L-929, una línea celular productora de GM-CSF (concentración aproximada 400 pg/mL)¹³⁹.

3.3. Líneas celulares

Las células epiteliales de túbulo renal proximal (línea celular murina MCT; proporcionadas por el Dr. Eric Neilson, Universidad de Vanderbilt, EEUU), se cultivaron en medio RPMI suplementado con 10% SFB deplementado, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina y 2 mM glutamina y se utilizaron a 60-70% de confluencia. La línea de células mesangiales (MC) murinas (SV40 MES 13, CRL-1927; American Type Culture Collection) se mantuvo en medio DMEM:F12 con 5% SFB deplementado, glutamina y antibióticos. La línea celular de macrófagos murinos (Raw264.7, TIB-71; American Type Culture Collection) se mantuvo en medio DMEM suplementado con 10% SFB, glutamina y antibióticos. Las células empaquetadoras HEK 293 (proporcionadas por el Dr. A. J. Rees, Universidad de Aberdeen, Reino Unido) se crecieron en medio DMEM con 10% SFB, glutamina y antibióticos.

3.4. Ensayos de viabilidad y proliferación celular

La viabilidad y/o proliferación celular se analizó mediante ensayo de MTT (1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan; Sigma). Las células en placas de 96 pocillos se

incubaron por triplicado y se tiñeron con 0.1 mg/mL MTT. La absorbancia del MTT metabolizado se midió a $\lambda=600$ nm en un lector de placas después de 48 horas en medio DMEM con 0.5% SFB en ausencia (viabilidad) o presencia de citoquinas (proliferación).

La proliferación celular también se determinó con el ensayo del azul de metileno. Las células estimuladas por triplicado en placas de 96 pocillos se fijaron en 10% formaldehído en PBS, se tiñeron con 1% azul de metileno y se lavaron con tampón borato 0.01 M. Una vez seca la placa, se eluyó el colorante con etanol: 0.1M HCl (1:1) y se leyó la absorbancia a $\lambda=620$ nm.

3.5. Ensayos de migración y adhesión celular

La capacidad migratoria se evaluó mediante experimentos de cierre de heridas (*wound-healing*). Se sembraron 3×10^5 células (CMLV y CM) en placas de 12 pocillos, se deplecionaron durante 24 horas en medio con 0.5% SFB y posteriormente se realizaron hendiduras de 1 mm con una punta de pipeta de plástico. Para determinar la velocidad de cierre de las hendiduras, se captaron cuatro imágenes de cada pocillo a diferentes tiempos de estimulación (0, 4, 8, 16, 24 horas), se cuantificó el área libre de células (Image-Pro Plus, Media Cybernetics) y se normalizaron respecto al tiempo inicial.

En los experimentos de trans migración (placas *transwell* de 24 pocillos y 8 μ m de poro, Corning), se resuspendieron 3×10^5 CMLV deplecionadas y se colocaron en la parte superior de los insertos en presencia o ausencia del péptido. En la parte inferior se añadió medio DMEM conteniendo el estímulo (citoquinas), permitiendo migrar a las CMLV hacia estos pocillos durante 12 horas a 37°C. Las células adheridas al otro lado de la membrana porosa se fijaron con 4% paraformaldehído y se tiñeron con 0.2% cristal violeta. Se cuantificaron cuatro campos al azar para cada inserto mediante microscopía óptica.

Para los ensayos de adhesión celular, las CMLV (1×10^4) se sembraron en placas de 96 pocillos y estimularon con citoquinas en presencia o ausencia del péptido SOCS1 durante 4 horas. Los macrófagos Raw264.7 se marcaron con 5 M calceína-AM (Sigma) durante 30 minutos a 37°C. Se añadieron 1×10^5 macrófagos/pocillo y se coincubaron con las CMLV durante 30 minutos. Las células no adherentes se retiraron y los macrófagos adheridos se lisaron en 0.1% SDS. Se midió la fluorescencia de cada pocillo a $\lambda_{exc}=485$ nm y $\lambda_{em}=530$ nm.

4. MODELOS EXPERIMENTALES

4.1. Animales empleados

Los modelos experimentales se realizaron con ratones macho deficientes en el gen de la apolipoproteína E ($\text{apoE}^{-/-}$, cepa C57BL/6; Jackson Laboratory) siguiendo la normativa europea y nacional vigente (Directiva 2010/63/EU, Recomendación 2007/526/EC y Real Decreto 53/2013) y fueron previamente aprobados por el comité ético de nuestra institución.

4.2. Modelo experimental de aterosclerosis

Para analizar el efecto de la terapia génica con SOCS1 en la aterosclerosis, ratones $\text{apoE}^{-/-}$ de 8 semanas (lesiones iniciales) o de 28 semanas (lesiones avanzadas) recibieron una inyección intravenosa (por la vena de la cola) de adenovirus recombinantes ($1-2 \times 10^{10}$ pfu en 250 μL) y se alimentaron con dieta grasa tipo Western (21% grasa y 0.15% colesterol; Harlan Labs) durante 5 semanas (**Figura 9**). Grupos de estudio: 1) Modelo de lesión inicial: controles no tratados ($n=15$), Ad-vacío ($n=14$), Ad-S1 ($n=16$); 2) Modelo de lesión avanzada: controles no tratados ($n=6$), Ad-vacío ($n=6$), Ad-S1 ($n=7$). Al finalizar el modelo, los animales se sacrificaron, recogiendo las muestras histológicas para su posterior estudio. En otros experimentos, para determinar la eficiencia de la transfección génica, los ratones se estudiaron a los 2-14 días de la inyección de Ad-vacío ($n=8$), Ad-GFP ($n=5$) o Ad-S1 ($n=8$).

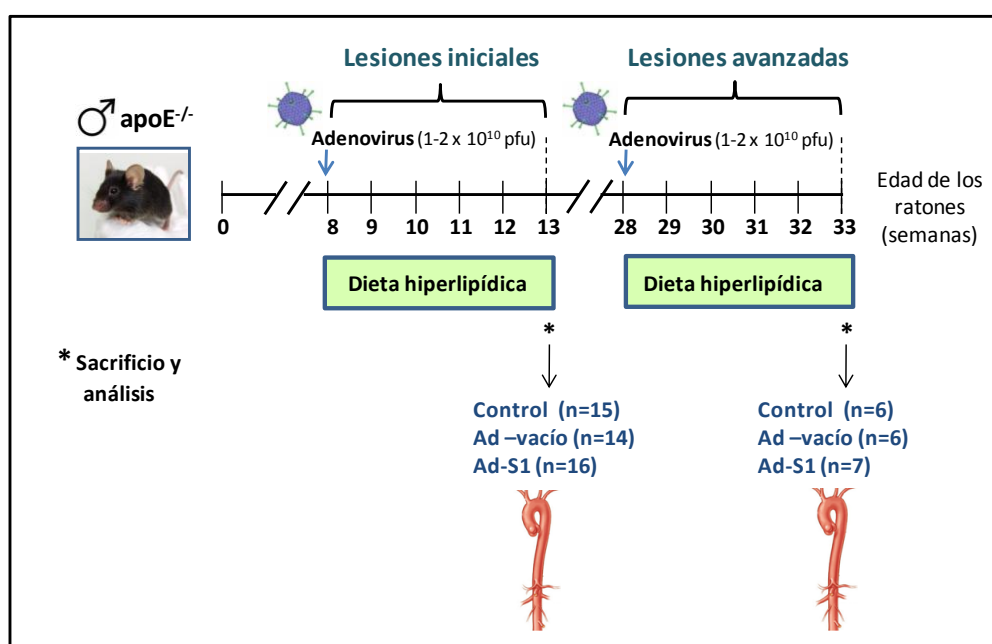


Figura 9. Esquema del protocolo experimental del modelo de aterosclerosis en ratones $\text{apoE}^{-/-}$ alimentados con dieta hiperlipídica.

4.3. Modelo experimental de diabetes

Protocolo I (Lesiones iniciales): Para inducir la diabetes tipo I empleamos estreptozotocina (STZ), una toxina producida por bacterias *Streptomyces* altamente tóxica para las células β -pancreáticas. Ratones apoE^{-/-} de **8 semanas** recibieron dos inyecciones intraperitoneales en días consecutivos de STZ (125 mg/kg/día, diluida en tampón citrato 10 mM pH 4.5; Sigma). Los animales diabéticos (glucemia >350 mg/dL) se dividieron en tres grupos: 1) Referencia (sacrificados 2 semanas después de la inyección de STZ; n=8); 2) Tratados con vehículo (0.1% DMSO en 200 μ L de solución salina; n=19); 3) Tratados con péptido SOCS1 (3.25 μ g/g de peso en 200 μ L; n=18). La administración se realizó por vía intraperitoneal 3 veces por semana durante 6 y 10 semanas (n=9-10 ratones/grupo) (**Figura 10**).

Protocolo II (Lesiones avanzadas): Diabetes inducida en ratones apoE^{-/-} de **22 semanas** según se indica en el protocolo I. Grupos de estudio: 1) Tratados con vehículo (0.1% DMSO; n=10), 2) Tratados con péptido SOCS1 (3.25 μ g/g de peso; n=10) y 3) Tratados con péptido mutante (MUT, 3.25 μ g/g de peso; n=8). La administración se realizó por vía intraperitoneal 3 veces por semana durante 10 semanas (**Figura 10**).

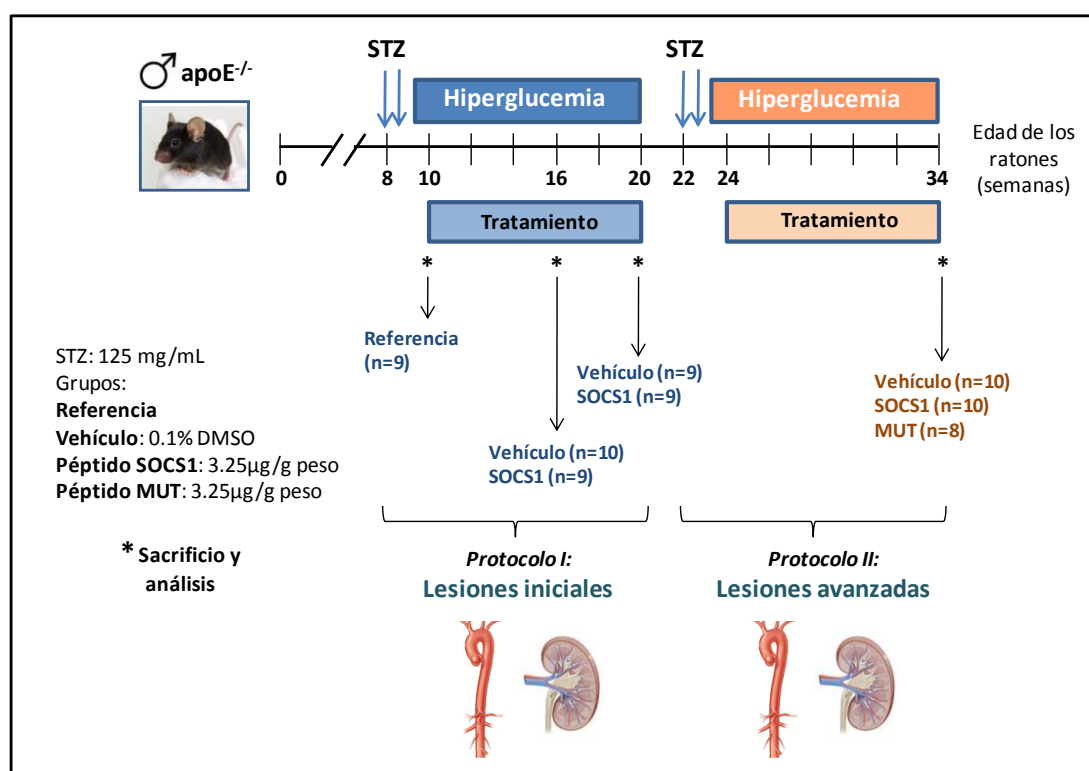


Figura 10. Esquema del protocolo experimental de diabetes en ratones apoE^{-/-}.

Como controles no diabéticos se emplearon ratones apoE^{-/-} normoglucémicos de la misma edad (n=5). Los ratones se mantuvieron con acceso libre a agua y comida (dieta estándar), realizando controles de peso y glucemia (glucómetro de tiras convencional) cada 2-3 días. Los animales con glucemia ≥ 520 mg/dL recibieron una inyección subcutánea de 0.4 U insulina para prevenir su muerte. Al finalizar el modelo, los animales fueron anestesiados, perfundidos con salino y sacrificados, recogiendo las muestras para su posterior estudio.

Para los estudios de localización, un grupo de ratones (n=8) recibió una única inyección de péptido SOCS1 fluorescente y se analizaron los tejidos después de 3, 6, 16 y 24 horas.

4.4. Procesamiento de los tejidos

Al final del estudio, los ratones ayunados durante 16 horas se anestesiaron (100 mg/kg ketamina y 15 mg/kg xilazina) y se tomaron muestras de sangre mediante punción retro-orbital. A continuación, tras abrir la cavidad abdominal, se canuló el corazón por el ventrículo izquierdo para perfundir con suero salino, realizando una punción de escape en la vena cava inferior. Se extrajo la aorta desde el corazón hasta la bifurcación, se eliminó el tejido graso adherido y se dividió en dos secciones: el arco aórtico (el tercio más cercano al corazón) se incluyó en OCT (Tissue-Tek) para su congelación; los tercios torácico y abdominal se guardaron en N₂ líquido para estudios de expresión génica. Los riñones extraídos se decapsularon y se pesaron. Una parte se fijó en 4% paraformaldehído y se incluyó en parafina para histología; del resto se obtuvo la corteza renal y se conservó en N₂ líquido. Las muestras de hígado y bazo se procesaron para histología y estudios de RNA.

4.5. Análisis bioquímicos

Las concentraciones séricas de lípidos (colesterol total, HDL, LDL y triglicéridos), glucosa y transaminasas (aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT)) se midieron por métodos automatizados. Los niveles de hemoglobina glicosilada (GHbA1c) en sangre (Gentaur) y de albúmina en orina (Cell Trend) se midieron por ELISA. La creatinina en suero y orina se cuantificó enzimáticamente (método de la creatininas, Abcam).

4.6. Citometría de flujo

El estudio de citometría se realizó en muestras de bazo, médula ósea de fémur y sangre tamponada con EDTA. Para obtener la suspensión celular de bazo y médula ósea empleamos un tamiz de 75 μ m y lavados con tampón PBS con 1% SFB y 1% BSA. Las suspensiones celulares tratadas con solución de lisis de eritrocitos (Becton Dickinson) se incubaron con Ab

específicos para las diferentes poblaciones leucocitarias de ratón (**Tabla 3**) y se analizaron con un citómetro de flujo FACS Canto II y el software FACSDiva (BD Biosciences).

Ab	Tipo celular	Casa comercial	Fluorocromo
CD45	Leucocitos totales	BD Biosciences	FITC (isotiocianato de fluoresceína)
CD19	Linfocitos B	BD Biosciences	PE (ficoeritrina)
CD3	Linfocitos T	BD Biosciences	PE-Cy7 (cianina 7)
CD4	Linfocitos T CD4	BD Biosciences	PE
CD8a	Linfocitos T CD8	BD Biosciences	FITC
CD115	Monocitos	eBioscience	PE
Ly6C	Monocitos activados	eBioscience	APC (aloficocianina)

Tabla 3. Condiciones empleadas en la citometría de flujo.

5. ANÁLISIS HISTOLÓGICO

5.1. Histología e inmunohistoquímica en aorta

En el análisis *en face*, la aorta completa y abierta longitudinalmente se tiñó con Sudan IV para cuantificar el contenido lipídico. El área y composición de las placas ateroscleróticas se evaluó en criocortes transversales seriados del arco aórtico (8 µm a lo largo de ≈1000 µm, origen en el inicio de las tres válvulas aórticas del corazón) teñidos con Oil-Red-O (Sigma) y hematoxilina.

El contenido de colágeno en las placas se evaluó mediante tinción de rojo sirio con ácido pícrico (rojo picrosirio), un colorante para fibras conectivas compuestas principalmente por colágeno. Los cortes fijados con 2% formaldehído en salino y lavados con etanol se tiñeron durante 2 horas con rojo picrosirio. Después de 3 lavados con etanol, se deshidrataron con xilol durante 5 minutos y se montaron con resina acrílica con base de xileno (DPX, EMS). Las tinciones se evaluaron en un microscopio con luz polarizada (DMD108; Leica Microsystems).

Para la detección de macrófagos (MOMA-2) y quimioquinas (CCL2 y CCL5), los cortes de aorta se fijaron con acetona durante 10 minutos y se inactivó la actividad peroxidasa endógena con 3% H₂O₂:metanol (1:1) durante 30 minutos. A continuación, se eliminaron las uniones inespecíficas con PBS conteniendo 4% BSA y suero de la especie del Ab secundario. Los cortes se incubaron entonces a 4°C durante toda la noche con el Ab primario (**Tabla 4**). Tras lavar las muestras, se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente con los Ab secundarios conjugados con biotina y diluidos en PBS con 4% BSA. Después se trataron con

el complejo avidina-biotina (ABComplex; Dako) y el cromógeno DAB, se contrastaron con hematoxilina de Mayer y se montaron con gelatina glicerilada (Merck).

Para la inmunohistoquímica de linfocitos T ($CD3^+$ y $CD4^+$) y de la citoquina $TNF\alpha$, los cortes se fijaron en acetona fría y se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en solución de bloqueo (PBS con 1% BSA, 0.1% gelatina, 0.1% Triton-X, 0.05% Tween-20 y 0.05% NaN_3 y 6% suero de la especie del Ab secundario). El Ab primario (**Tabla 4**) diluido en PBS conteniendo 1% BSA, 0.1% gelatina y 0.05% NaN_3 se incubó durante toda la noche a 4°C. Después de bloquear la actividad peroxidasa endógena con 0.3% H_2O_2 en metanol durante 20 minutos a temperatura ambiente, los cortes se incubaron con el Ab secundario diluido en PBS, seguido del complejo avidina-biotina y el sustrato DAB.

La detección de CMLV se realizó mediante inmunofluorescencia directa con un Ab anti- α -actina de músculo liso. La fosforilación de STAT1 y STAT3, así como la localización de macrófagos totales (Mac-3) y sus fenotipos M1 (ArgII) y M2 (ArgI) se analizaron mediante inmunofluorescencia indirecta (**Tabla 4**). Las muestras se contrastaron con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) y se montaron en Mowiol (Sigma).

Ab primario		Bloqueo (% Suero)	Ab secundario	
Antígeno	Dilución		Antígeno (marcaje)	Dilución
ArgI ¹	1/10	8% caballo ⁹	IgG cabra (Alexa Fluor 568) ⁶	1/200
ArgII ¹	1/10	8% oveja ⁹	IgG conejo (Alexa Fluor 568) ⁶	1/200
CD3 ²	1/200	8% caballo ⁹	IgG conejo (biotina) ¹⁰	1/400
CD4 ³	1/40	8% conejo ⁹	IgG rata (biotina) ¹¹	1/400
CCL2 ¹	1/30	8% caballo ⁹	IgG cabra (biotina) ¹⁰	1/500
CCL5 ⁴	1/100	8% caballo ⁹	IgG conejo (biotina) ¹⁰	1/300
Mac-3 ³	1/10	3% caballo ⁹	IgG rata (Alexa Fluor 488) ⁶	1/200
MOMA-2 ⁵	1/800	10% conejo ⁹	IgG rata (biotina) ¹¹	1/1000
P-STAT1 (Tyr701) ⁶	1/40	8% oveja ⁹	IgG conejo (Alexa Fluor 568) ⁶	1/200
P-STAT3 (Ser727) ⁷	1/20	8% caballo ⁹	IgG cabra (Alexa Fluor 488) ⁶	1/200
$TNF\alpha$ ¹	1/20	6% caballo ⁹	IgG cabra (biotina) ¹⁰	1/200
α -actina-FITC ⁸	1/200	6% de BSA ⁸	-	-

Tabla 4. Condiciones empleadas para la inmunohistoquímica en aorta. Reactivos administrados por:

¹Santa Cruz, ²DAKO, ³BD Biosciences, ⁴Ab online, ⁵Serotec, ⁶Invitrogen, ⁷Cell Signaling, ⁸Sigma, ⁹Chemicon, ¹⁰GeHealthcare y ¹¹Thermo scientific.

La adquisición de imágenes se realizó en un microscopio invertido de luz visible y epi-fluorescencia (Eclipse 4000) con los programas de análisis de imágenes ACT-1 (Nikon) y MetaMorph (Molecular Devices). La tinción positiva se cuantificó en al menos 3 secciones

por ratón empleando el programa Image-Pro plus y se expresó como porcentaje o número de células positivas por área de lesión.

5.2. Histología e inmunohistoquímica en riñón

Secciones de 4 μ m del tejido renal incluido en parafina se montaron en portaobjetos recubiertos de poli-L-lisina, se desparafinaron con xilol y se hidrataron con gradiente decreciente de etanol. La morfología de los riñones se evaluó mediante microscopía óptica tras tinción con ácido periódico de Schiff (PAS). Para cuantificar las lesiones renales se examinaron mediante doble ciego al menos 30 glomérulos y 20 campos de tubulointersticio (aumentos x100) de cada animal. El daño glomerular se definió como aumento de la matriz mesangial, proliferación mesangial, aparición de células infiltrantes y dilatación capilar. En los túbulos se evaluó la aparición de lesiones degenerativas del epitelio, atrofia tubular, inclusiones de glucógeno y núcleos claros. En el intersticio se determinó el grado de fibrosis e infiltrado. La tinción se valoró de forma semicuantitativa en una escala de 0 a 3: 0 (negativo), 1 (débil), 2 (moderada) y 3 (intensa). En las muestras renales teñidas con PAS también cuantificamos el área glomerular y el área mesangial mediante morfometría.

Para cuantificar la fibrosis por tinción de rojo picrosirio, los cortes desparafinados se rehidrataron durante 5 días a 4°C en 70% etanol, se lavaron con agua y se tiñeron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se deshidrataron y se montaron con DPX.

El infiltrado renal de linfocitos T (CD3) y macrófagos (F4/80) se determinó mediante inmunohistoquímica. Tras desparafinar y rehidratar las muestras se realizó la recuperación antigénica en solución citrato a pH 6 (PTlink) y se inactivó la peroxidasa endógena con 3% H₂O₂:metanol (1:1) durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de lavar las muestras en PBS, se bloquearon las uniones inespecíficas (PBS con 4% BSA y suero del Ab secundario; 1 hora a temperatura ambiente) y se incubaron con los Ab primarios a 4°C durante toda la noche (**Tabla 5**). Tras un lavado con PBS, las secciones se incubaron a temperatura ambiente con los Ab secundarios conjugados con biotina (1 hora) y luego con el complejo avidina-biotina y el sustrato DAB. Las secciones contrastadas con hematoxilina y deshidratadas se montaron con DPX. Para descartar tinción inespecífica se realizó un control negativo de cada muestra omitiendo el Ab primario.

Para la cuantificación de las inmunohistoquímicas y otras tinciones (al menos 15 campos por sección renal, aumento x200) se utilizó el Software Image Pro-Plus (Media Cybernetics). La tinción positiva se expresa como porcentaje de área teñida respecto del área total evaluada

en cada muestra. Las células F4/80⁺ y CD3⁺ se expresan como número de células positivas por glomérulo o como número de células intersticiales positivas por mm² en cada muestra.

Tinción	Ab primario		Bloqueo (% Suero)	Ab secundario	
	Antígeno	Dilución		Antígeno (marcaje)	Dilución
Linfocitos T	CD3 ¹	1/200	6% caballo ⁵	IgG conejo (biotina) ⁶	1/200
Monocitos/ macrófagos	F4/80 ²	1/100	6% oveja ⁵	IgG rata (biotina) ⁷	1/200
STAT1	P-STAT1 (Tyr701) ³	1/40	6% caballo ⁵	IgG conejo (biotina) ⁶	1/400
STAT3	P-STAT3 (Ser727) ⁴	1/40	6% caballo ⁵	IgG conejo (biotina) ⁶	1/400

Tabla 5. Condiciones empleadas para la inmunohistoquímica renal. Ab y sueros administrados por: ¹DAKO, ²Serotec, ³Invitrogen, ⁴Cell Signaling, ⁵Chemicon, ⁶GeHealthcare y ⁷Thermo Scientific.

6. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

6.1. Extracción de proteínas totales

Las células (despegadas de la placa de cultivo y lavadas con salino frío) y las muestras de tejido aórtico/renal (pulverizado bajo N₂ líquido) se homogeneizaron con tampón de lisis frío (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0.2% Triton X-100, 0.3% NP-40, 0.2 mM PMSF, 0.2 mM Na₃VO₄ y 10 µL/mL cóctel de inhibidores de proteasas). La concentración de proteínas se cuantificó por el método del BCA (ácido bicinconínico, Pierce).

6.2. Western blot

Las proteínas procedentes de lisados celulares o tisulares (15-25 µg) o de sobrenadantes celulares se desnaturalizaron (5 minutos a 95°C en tampón de carga), se separaron por electroforesis en geles de PAGE-SDS y se transfirieron a membranas de PVDF (fluoruro de polivinilideno; Millipore). Para evitar uniones inespecíficas, las membranas se bloquearon durante 1 hora a temperatura ambiente en tampón TBSt (1 mM Tris pH 7.5, 10 mM NaCl y 0.1% Tween-20) conteniendo 5% de leche desnatada. A continuación se incubaron con los diferentes Ab primarios (**Tabla 6**) durante toda la noche a 4°C. Tras sucesivos lavados en TBSt, las membranas se incubaron con el correspondiente Ab secundario conjugado con HRP durante 1 hora a temperatura ambiente. Tras eliminar el exceso de Ab mediante sucesivos lavados, las bandas se detectaron por quimioluminiscencia ECL (Amersham) y se densitometraron con el software ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Bio-sciences). Los Ab frente a α -tubulina y β -actina se emplearon como control de carga.

Ab primario			Ab secundario	
Antígeno	Casa comercial	Dilución	Antígeno (huésped)	Dilución
Fibronectina	Chemicon	1/5000	IgG conejo HRP (burro)	1/2000
P-STAT1	Invitrogen	1/500	IgG ratón HRP (oveja)	1/2000
P-STAT3	Cell Signaling	1/500	IgG conejo HRP (burro)	1/2000
SOCS1	Invitrogen	1/200	IgG conejo HRP (burro)	1/2000
SOCS3	Santa Cruz	1/200	IgG conejo HRP (burro)	1/2000
α -tubulina	Sigma	1/5000	IgG ratón HRP (oveja)	1/2000
β -actina	Santa Cruz	1/2000	IgG ratón HRP (oveja)	1/2000

Tabla 6. Condiciones utilizadas para Western blot. Ab secundarios suministrados por GeHealthcare.

6.3. Inmunocitofluorescencia

Las células se crecieron en portaobjetos con 4 cámaras tratados para el crecimiento celular (LabTek). Una vez finalizado el experimento, las células se lavaron, se fijaron con 4% paraformaldehído durante 10 minutos y se permeabilizaron con 0.5% Triton X-100 durante 10 minutos. Después de bloquear las uniones inespecíficas con PBS conteniendo 4% BSA y 6% de suero, las células se incubaron durante toda la noche con los Ab primarios (**tabla 7**). A continuación se lavaron e incubaron con los Ab secundarios durante 1 hora, se lavaron y los núcleos se tiñeron con DAPI. Por último, las muestras se montaron con FluorSave (Calbiochem) y la fluorescencia se detectó mediante microscopia confocal (Confocal System TCS SP5; Leica).

Ab primario		Suero	Ab secundario		
Antígeno	Dilución		Antígeno	Marcaje	Dilución
SOCS1 ¹	1/100	caballo ²	IgG conejo ³	FITC	1/200
P-STAT1 (Tyr701) ¹	1/75	caballo ²	IgG ratón ³	Alexa Fluor 488	1/200
P-STAT3 (Tyr705) ¹	1/75	caballo ²	IgG cabra ³	Alexa Fluor 488	1/200

Tabla 7. Condiciones empleadas para la inmunofluorescencia en células. Ab y sueros fueron administrados por: ¹Santa Cruz, ²Chemicon e ³Invitrogen.

6.4. Ensayo de gen reportero

Empleamos dos plásmidos conteniendo sitios de unión para STAT1 (pGAS-Luc) y STAT3 (pSTAT3-Luc) insertados en el gen reportero de luciferasa de *Photinus pyralis* (pTA-Luc) y el vector control luciferasa de *Renilla* (pRL-TK) en relación 10:1. Las células sembradas en placas de 12 pocillos se transfectaron con los vectores reporteros empleando FuGENE (Roche) como reactivo de transfección (proporción 3:1) en presencia de adenovirus

recombinantes (Ad-S1 o Ad-vacío; multiplicidad de infección=40). Después de 24 horas, las células se estimularon con citoquinas durante 16 horas y se lisaron en 100 µL de tampón de lisis (Dual Luciferase Assay System, Promega). La actividad luciferasa se midió en un luminómetro (Berthold) y los valores se normalizaron teniendo en cuenta la concentración de proteínas (método BCA) y la eficiencia de la transfección (actividad *Renilla*).

6.5. ELISA

La concentración de CCL2 y CCL5 en sobrenadantes celulares y lisados tisulares se determinó mediante ELISA (BD Biosciences y eBiosciences, respectivamente) empleando una curva estándar de las quimioquinas recombinantes y el sustrato TMB (3,3',5,5'-tetrametilbencidina) para la detección colorimétrica. La absorbancia se midió en un lector de placas de ELISA, expresando los valores en ng/mL (CCL2) o pg/mL (CCL5).

7. ANÁLISIS DE RNA

7.1. Extracción de RNA

El RNA total procedente de cultivos celulares y tejidos (aorta, riñón, hígado y bazo) se extrajo con Trizol (Sigma). La cuantificación del RNA se realizó por medida de absorbancia a 260 nm (Nanodrop 2000, Thermo Scientific), teniendo en cuenta que 1 unidad de absorbancia corresponde a 40 µg/mL RNA. También se comprobó si la relación entre las absorbancias a 260 nm y 280 nm era cercana a 2, indicativo de ausencia de contaminación proteica.

7.2. PCR cuantitativa a tiempo real

Para obtener cDNA realizamos una reacción de transcripción inversa a partir de 1.5 µg de RNA usando el High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems) en un termociclador convencional (PTC-100, MJ Research Inc) con las siguientes condiciones: 10 minutos a 25°C, 2 horas a 37°C y 5 minutos a 85°C.

La PCR a tiempo real se llevó a cabo mediante dos sistemas diferentes. En unos casos se utilizó el sistema de detección secuencial Taqman ABI 7700 con TaqDNA polimerasa activada por calor (Amplitaq Gold) y cebadores comerciales (base de datos de Applied Biosystems) (**Tabla 8**), realizando un paso inicial de 2 minutos a 50°C y 10 minutos a 95°C, tras el cual las muestras se sometieron a 40 ciclos de 15 segundos a 95°C y 1 minuto a 60°C. En otros casos se utilizaron sondas no comerciales (diseñadas con el software Primer-BLAST (NCBI-NIH) y sintetizadas por Fisher Scientific; **Tabla 8**) y la polimerasa suministrada en la mezcla SYBR

Premix Ex Taq (Takara), realizando un programa de tres pasos (2 minutos a 50°C; 5 minutos a 95°C; 1 minuto a 94°C, 40 segundos a 60°C y 40 segundos a 72°C) más uno de disociación (15 segundos a 98°C). Los resultados de la amplificación del gen de interés se normalizaron con los datos obtenidos del control interno (18S) amplificado en paralelo. Todas las medidas se hicieron por duplicado y se analizaron usando el programa informático 7500 System SDS Software V1.2b1c3 (Applied Biosystems).

Gen	Código del cebador	Gen	Código del cebador
<i>Ccl2</i> ¹	Mm00441242_m1	<i>Icam1</i> ¹	Mm00516023_m1
<i>Ccl5</i> ¹	Mm01302428_m1	<i>Ifnγ</i> ¹	Mm01168134_m1
<i>Ccr2</i> ¹	Mm00438270_m1	<i>Il-17</i> ¹	Mm00439618_m1
<i>Ccr5</i> ¹	Mm01963251_s1	<i>Il4</i> ¹	Mm00445259_m1
<i>Cd204</i> ¹	Mm00446214_m1	<i>Kim-1</i> ¹	Mm00506686_m1
<i>Cd36</i> ¹	Mm01135198_m1	<i>Socs1</i> ¹	Mm00782550_s1
<i>Col1</i> ¹	Mm00801574_m1	<i>Socs3</i> ¹	Mm00545913_s1
<i>Cxcl10</i> ¹	Mm00445235_m1	<i>Tgfβ</i> ¹	Mm01178820_m1
<i>Fn</i> ¹	Mm 01256734_m1	<i>Tnfa</i> ¹	Mm00443258_m1
<i>Foxp3</i> ¹	Mm00475162_m1	<i>18S</i> ²	4310893E
	Secuencia cebador directo (5' - 3')		Secuencia cebador inverso (5' - 3')
<i>Arg1</i> ³	TTAGGGTTACGGCCGGTGGAGAGGA		TGCTGCATGTGCTCGGGCTGT
<i>Arg11</i> ³	TTGGCCTGAGAGATGTGGAGCCTCC		ACTCAGGTGGATTGGCCTCTGCC
<i>Nox1</i> ³	CCAACAGGCCATGGATGGAT		CACTCCAGTAAGGCCAGCAA
<i>Nox2</i> ³	AACTCAGAATCCGGCCCGCGT		AGGGGGCCTGTGTCATTGTGATT
<i>Nox4</i> ³	CCCTCCTGGCTGCATTAGTC		AACCCTCGAGGCCAAGATCC
<i>NoxA1</i> ³	GCTAAGGTGGTGGCTTCTGT		CATATAGGCCAGGGCTCGTG
<i>NoxO1</i> ³	GCGGCAAAATTGGGGTCTT		GCTAGAGGATGAGGACACGC
<i>P22phox</i> ³	AGTGAGGACTTGC GAAGTGG		CCTGCAGCGATAGAGTAGGC
<i>P47phox</i> ³	TGGAGGGCAGAGACAATCCA		GGGATAGGAGCCGTCTAGGG
<i>P67phox</i> ³	GCCGACAAGAAGGACTGGAA		AAGCAAATCCTCGAGTGGGG
<i>18S</i> ³	CCGTCGTAGTCCGACCATAA		CAGCTTTGCAACCATACTCCC

Tabla 8. Cebadores murinos empleados en la PCR a tiempo real. Marcaje: ¹FAM, ²VIC o ³Sybr Green).

8. MEDIDA DE ESTRÉS OXIDATIVO

8.1. Detección de ROS por fluorescencia

La producción de anión superóxido intracelular en tejido aórtico fue analizada mediante tinción con la sonda fluorescente dihidroetidina (DHE, Molecular Probes)¹⁴⁰. Las muestras se incubaron en la oscuridad con 2 μ M DHE durante 30 minutos a 37°C y, después de 3 lavados en PBS, se contrastaron con DAPI y se montaron con FluorSave. Para la detección de anión

superóxido *in vitro*, las CMLV sembradas en cubreobjetos con 4 cámaras se incubaron con 2.5 μM DHE en KRB-HEPES, durante 30 minutos a 37°C. Tras varios lavados para eliminar el exceso de sonda fluorescente, las CMLV se estimularon, se fijaron con 1.5% paraformaldehído, se contrastaron con DAPI y se montaron. En ambos casos, las muestras se visualizaron mediante microscopía de fluorescencia ($\lambda_{\text{exc}}=488\text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}}=585\text{ nm}$). Los niveles de ROS se expresaron como número de células DHE positivas vs células totales (tinción nuclear con DAPI).

8.2. Actividad NADPH oxidasa

La producción de ROS en los cultivos celulares se determinó por medida de la actividad enzimática de la NADPH oxidasa. El complejo NADPH oxidasa utiliza como sustrato donador de electrones NADPH reducido para generar $\text{O}_2^{\bullet-}$, lo que se acompaña de una emisión débil de luz. En estas condiciones, la amplificación de la quimioluminiscencia se produce por la presencia en el medio de lucigenina, compuesto capaz de oxidarse por los radicales libres generados y emitir una mayor intensidad de luz, lo que facilita su detección y medida. En estos experimentos, las células se lisaron en tampón fosfato 50 mM ($\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$) conteniendo 0.01 mM EDTA, 0.32 M sacarosa y cocktail de inhibidores de proteasas y se transfirieron a tubos Röhren en un luminómetro Sirius (Berthold). La reacción se inició por adición del reactivo (5 μM lucigenina) y el sustrato (100 μM NADPH), cuantificando la emisión de luz por oxidación de la lucigenina cada 10 segundos durante 10 minutos. La producción de ion superóxido se expresó en unidades de quimioluminiscencia por mg de proteína celular. En algunos experimentos, las células se trataron con 500 μM apocinina, un inhibidor de la NADPH oxidasa.

9. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todas las valoraciones se determinaron por duplicado o triplicado. Los datos se expresan como media \pm error estándar (EEM) del número total de experimentos (estudios *in vitro*) o de animales (estudios *in vivo*). El análisis estadístico se realizó con el programa Prism 5 (Graphpad Software) empleando la prueba t-Student o el test de ANOVA (una o dos vías) seguido del test de Bonferroni para comparaciones múltiples y considerando diferencias significativas aquellas con valores de $P < 0.05$. La distribución normal y la homogeneidad de los datos se comprobaron mediante las pruebas de D'Agostino-Pearson y Bartlett, respectivamente.

IV. Resultados

1. LA TERAPIA GÉNICA CON LA PROTEÍNA REGULADORA SOCS1 COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA EN LA ATEROSCLEROSIS

La activación crónica de la vía JAK/STAT contribuye a la inflamación vascular durante la aterosclerosis a través de la inducción de genes clave en el reclutamiento de leucocitos, la migración y proliferación de CMLV, la apoptosis y la formación de células espumosas. Estudios funcionales en modelos animales han demostrado el importante papel de la proteína reguladora SOCS1 en el control de las respuestas celulares mediadas por JAK/STAT. En este trabajo investigamos si la inducción de la proteína SOCS1 podría ser una potencial estrategia terapéutica en enfermedades cardiovasculares. Para llevar a cabo estos estudios, desarrollamos un vector de expresión del gen SOCS1 para su aplicación en terapia génica experimental. Seleccionamos un vector adenoviral de primera generación (Ad5 con delección de la región E1-E3) por su alta eficacia de transducción, amplio tropismo y fácil producción a gran escala. El objetivo principal fue analizar las propiedades antiinflamatorias y ateroprotectoras del adenovirus que codifica la proteína SOCS1, tanto *in vitro* (CMLV y macrófagos en condiciones inflamatorias) como *in vivo* (modelo murino de aterosclerosis).

1.1. EFECTO *IN VITRO* DEL ADENOVIRUS SOCS1

Las acciones *in vitro* de la inducción de SOCS1 mediada por adenovirus se analizaron en CMLV y macrófagos, dos componentes celulares que participan activamente en el desarrollo de la placa de ateroma. Las células se infectaron durante 24 horas con adenovirus de SOCS1 (Ad-S1) y su control sin la expresión del gen de interés (Ad-vacío) y luego se estimularon con una combinación de citoquinas inflamatorias (10^3 U/mL IFN γ y 10^2 U/mL IL-6).

1.1.1. Inhibición de la activación de STAT mediada por adenovirus SOCS1

Los estudios de inmunofluorescencia (**Figura 11, A y B**) y Western blot (**Figura 11C**) en CMLV demostraron que la infección con Ad-S1 inducía un aumento de la síntesis proteica de SOCS1 y prevenía la fosforilación en tirosina de STAT1 y STAT3 inducida por citoquinas, así como su posterior translocación al núcleo. De manera similar, los ensayos de gen reportero en macrófagos Raw264.7 mostraron que SOCS1 suprimía la actividad transcripcional de STAT1 y STAT3 inducida por citoquinas (**Figura 11D**).

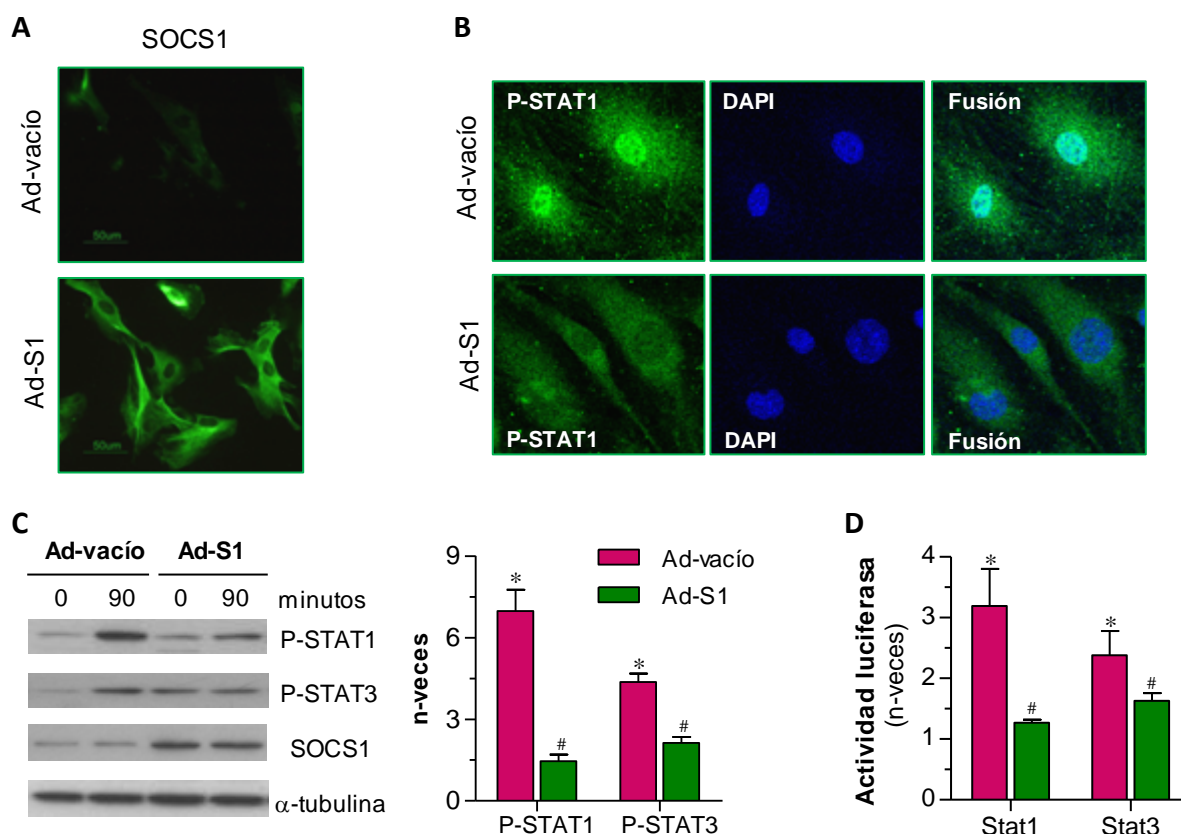


Figura 11. Efectos *in vitro* de la inducción de SOCS1. (A) Inmunofluorescencia de SOCS1 en CMLV infectadas con Ad-vacío o Ad-S1. (B) Distribución de P-STAT1 en CMLV a los 60 minutos de estimulación con IFN γ e IL-6. Se observa ausencia de tinción nuclear verde en las células infectadas con Ad-S1. Imágenes representativas (verde, P-STAT1; azul, núcleos; n= 3 experimentos). (C) Análisis por Western blot de P-STAT1, P-STAT3 y SOCS1 en CMLV infectadas y estimuladas durante 90 minutos con citoquinas. (D) Ensayo de gen reportero para STAT1 y STAT3 en macrófagos Raw264.7 a las 16 horas de estimulación. Los valores se expresan como incremento vs basal y son media \pm EEM de 4-6 experimentos. *P<0.05 vs basal; #P<0.05 vs Ad-vacío.

1.1.2. Regulación de mediadores inflamatorios por el adenovirus de SOCS1

A continuación se evaluó el efecto de la transfección de SOCS1 en la expresión de genes dependientes de JAK/STAT inducidos por la estimulación con citoquinas. Se analizaron los niveles de las quimioquinas CCL2 y CCL5, la molécula de adhesión ICAM-1 y la citoquina TNF α , por la importancia de estos mediadores en la inflamación durante el desarrollo de aterosclerosis. El análisis por PCR cuantitativa mostró un notable descenso en los niveles de mRNA de los cuatro mediadores inflamatorios en las CMLV tratadas con Ad-S1 en comparación con el control Ad-vacío (**Figura 12A**). La infección con Ad-S1 también redujo la secreción al medio extracelular de las quimioquinas CCL2 (**Figura 12B**) y CCL5 (**Figura 12C**), tanto en CMLV como en macrófagos Raw264.7 incubados con citoquinas.

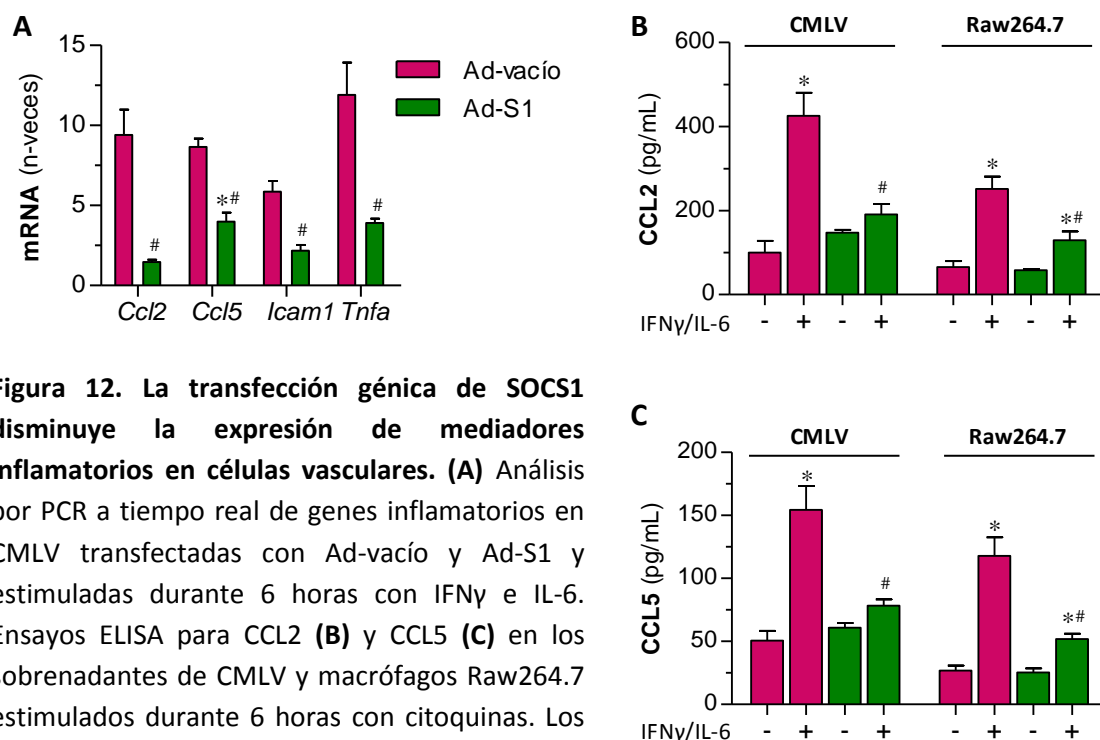


Figura 12. La transfección génica de SOCS1 disminuye la expresión de mediadores inflamatorios en células vasculares. (A) Análisis por PCR a tiempo real de genes inflamatorios en CMLV transfectadas con Ad-vacío y Ad-S1 y estimuladas durante 6 horas con IFN γ e IL-6. Ensayos ELISA para CCL2 (B) y CCL5 (C) en los sobrenadantes de CMLV y macrófagos Raw264.7 estimulados durante 6 horas con citoquinas. Los valores son media \pm EEM de 4-6 experimentos. *P<0.05 vs basal; #P<0.05 vs Ad-vacío.

Ya que el adenovirus de SOCS1 era capaz de regular la expresión de mediadores proinflamatorios en las células infectadas, se propuso profundizar en los posibles efectos que ejercía sobre la polarización de los macrófagos *in vitro*. Para ello, se realizaron estudios en macrófagos peritoneales infectados con adenovirus y se analizó la expresión génica de las isoformas de arginasa (ArgI y ArgII) como marcadores fenotípicos que distinguen los macrófagos proinflamatorios clásicos M1 (ArgII) de los macrófagos de activación alternativa antiinflamatoria M2 (ArgI). Se observó que el Ad-S1 inducía la polarización al fenotipo M2, limitando a su vez la acumulación de macrófagos proinflamatorios M1 (Figura 13A). En macrófagos peritoneales de ratón se analizó también la expresión de CD204 y CD36, dos receptores *scavenger* implicados en la internalización de partículas LDL modificadas y en la formación de células espumosas durante el desarrollo de la lesión aterosclerótica. Observamos que la infección con Ad-S1 inhibió significativamente la expresión génica de ambos receptores en los macrófagos estimulados con citoquinas (Figura 13B).

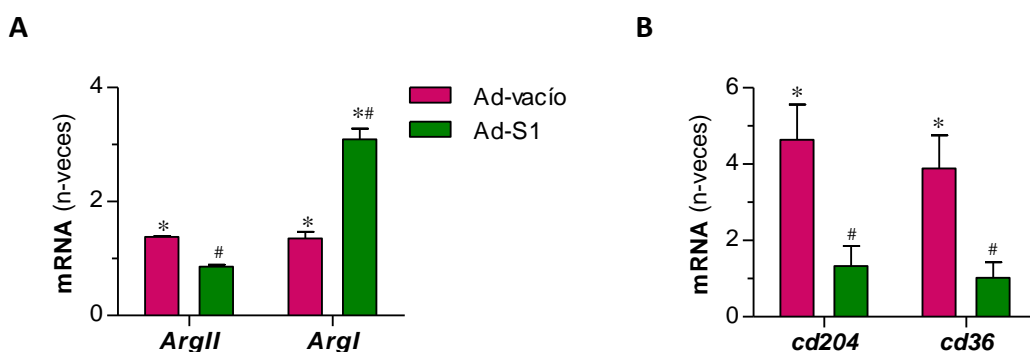


Figura 13. Efecto de la transfección génica de SOCS1 en los macrófagos peritoneales. Análisis por PCR a tiempo real de la expresión de marcadores de polarización de macrófagos M1 (ArgII) y M2 (ArgI) (A) y de receptores *scavenger* (B) en macrófagos transfectados con adenovirus y estimulados durante 6 horas con IFN γ e IL-6. Media \pm EEM de 4-6 experimentos. *P<0.05 vs basal; #P<0.05 vs Ad-vacío.

1.1.3. Impacto del adenovirus SOCS1 en la proliferación y migración celular

En otra serie de experimentos, se quiso estudiar si la sobreexpresión de SOCS1 alteraba la proliferación y migración celular, dos procesos clave en la formación de la placa aterosclerótica. Los ensayos colorimétricos de proliferación celular (Figura 14) demostraron que la infección con Ad-S1 disminuía el efecto mitogénico de la estimulación con citoquinas, tanto en CMLV como en macrófagos Raw264.7.

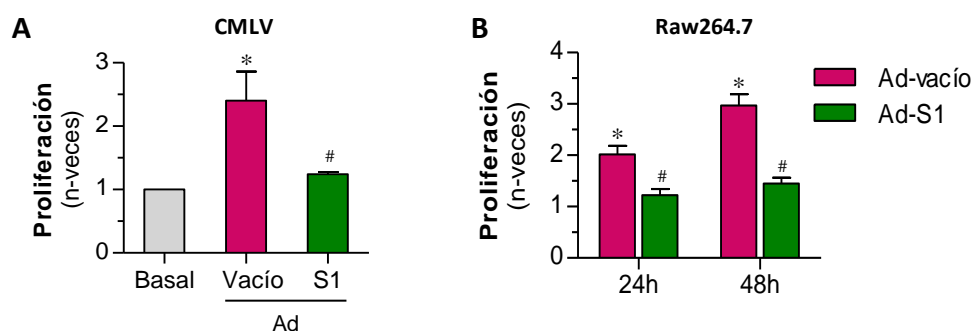


Figura 14. Efecto de SOCS1 en la proliferación celular. (A) Ensayo de azul de metileno en CMLV tratadas con Ad-vacío y Ad-S1 y estimuladas durante 24 horas con IFN γ e IL-6. (B) Proliferación de macrófagos Raw264.7 a diferentes tiempos de estimulación. Los valores de incremento respecto del basal son media \pm EEM de 4 experimentos por triplicado. *P<0.05 vs basal; #P<0.05 vs Ad-vacío.

Para determinar la capacidad migratoria y proliferativa de las CMLV en cultivo se realizaron ensayos de cierre de heridas (*wound healing*). Se observó una mayor capacidad de migración en las células estimuladas con IFN γ e IL-6 en comparación con las condiciones basales, mostrando un cierre de herida progresivo con el tiempo (Figura 15). Además, la transfección con el Ad-S1 inhibió significativamente esta capacidad migratoria y proliferativa de las CMLV.

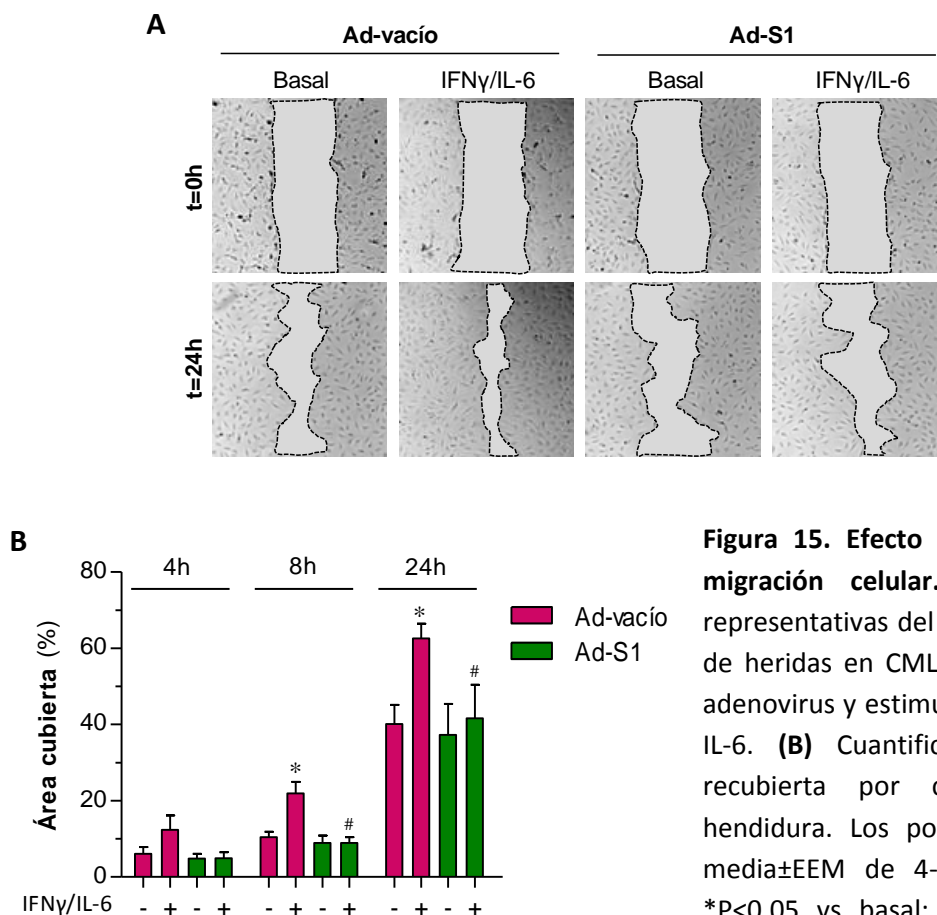


Figura 15. Efecto de SOCS1 en la migración celular. (A) Imágenes representativas del ensayo de cierre de heridas en CMLV infectadas con adenovirus y estimuladas con IFN γ e IL-6. **(B)** Cuantificación del área recubierta por células tras la hendidura. Los porcentajes son la media \pm EEM de 4-6 experimentos. *P<0.05 vs basal; #P<0.05 vs Ad-vacío.

1.2. ACCIONES *IN VIVO* DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ADENOVIRUS SOCS1 EN LA ATEROSCLEROSIS EXPERIMENTAL

1.2.1. Transferencia del gen *SOCS1* en ratones ateroscleróticos

Para evaluar la eficiencia de la transferencia génica de SOCS1 *in vivo* se seleccionó un grupo de ratones ateroscleróticos (apoE^{-/-} de 8 semanas de edad) a los que se inyectó por vía intravenosa una única dosis ($1-2 \times 10^{10}$ pfu) de Ad-S1, empleando como controles el adenovirus para la proteína fluorescente GFP (Ad-GFP) y el Ad-vacío. El análisis mediante PCR mostró un aumento de la expresión del transgen SOCS1 mayoritariamente en el hígado, pero también en el tejido aórtico de los ratones inyectados con Ad-S1 en comparación con el grupo Ad-vacío (**Figura 16A**). Se observó también un incremento gradual de la proteína SOCS1 en el tejido aórtico de los ratones, que se mantuvo elevada incluso 14 días después de la infección (**Figura 16B**). Mediante microscopía se detectó una intensa fluorescencia verde en las placas aórticas de los ratones transfectados con Ad-GFP, predominantemente en las áreas ricas en macrófagos (**Figura 16C**).

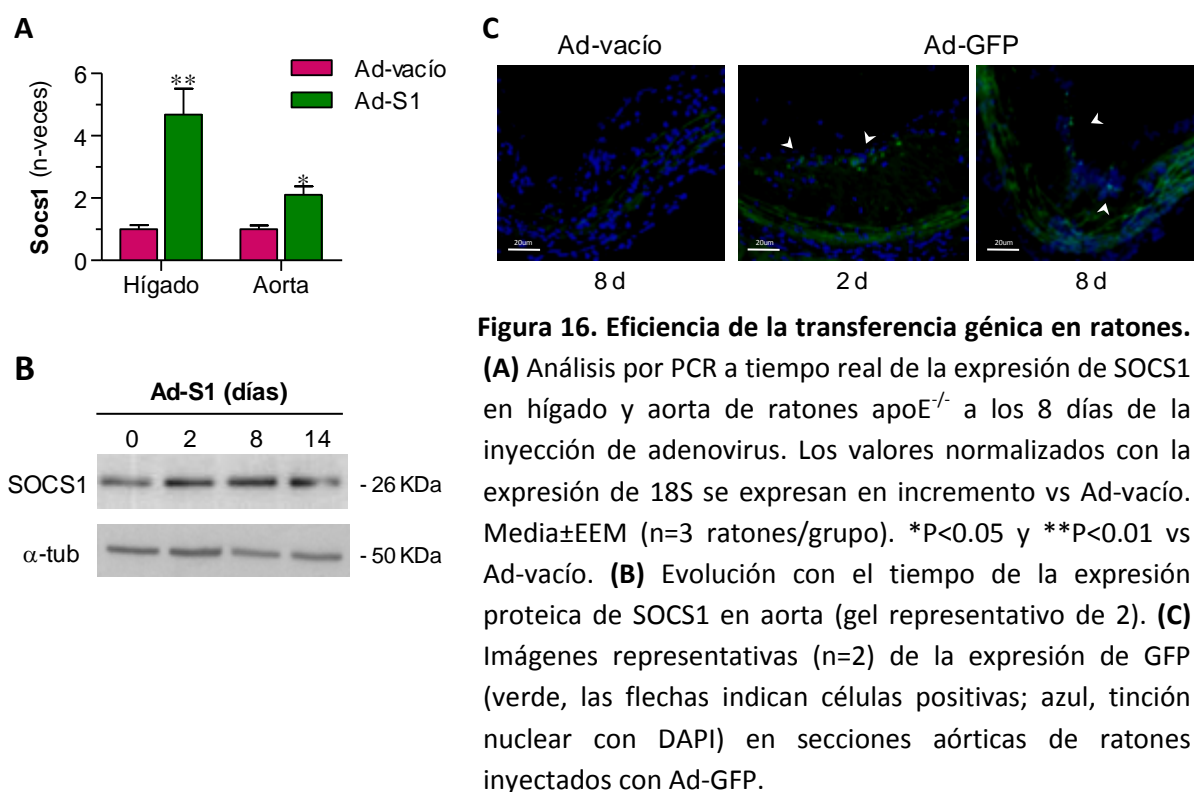


Figura 16. Eficiencia de la transferencia génica en ratones.

(A) Análisis por PCR a tiempo real de la expresión de SOCS1 en hígado y aorta de ratones apoE^{-/-} a los 8 días de la inyección de adenovirus. Los valores normalizados con la expresión de 18S se expresan en incremento vs Ad-vacío. Media±EEM (n=3 ratones/grupo). *P<0.05 y **P<0.01 vs Ad-vacío. **(B)** Evolución con el tiempo de la expresión proteica de SOCS1 en aorta (gel representativo de 2). **(C)** Imágenes representativas (n=2) de la expresión de GFP (verde, las flechas indican células positivas; azul, tinción nuclear con DAPI) en secciones aórticas de ratones inyectados con Ad-GFP.

1.2.2. La administración del gen SOCS1 inhibe la activación de STAT y reduce la aterosclerosis en el modelo experimental

El impacto de la administración del gen SOCS1 en el inicio y la progresión de la placa aterosclerótica se exploró en ratones apoE^{-/-} de 8 semanas (modelo de lesiones iniciales) y 28 semanas (modelo de lesiones avanzadas) de edad, que recibieron una inyección intravenosa de adenovirus (Ad-vacío o Ad-S1) y se alimentaron durante 5 semanas con dieta hiperlipídica (ver esquema en la **Figura 9**, página 31). Se incluyó también un grupo de ratones control de la misma edad sin tratamiento. El análisis mediante inmunofluorescencia demostró una reducción significativa de la activación de STAT (medida por fosforilación de STAT1 y STAT3) en las lesiones ateroscleróticas iniciales (13 semanas) y avanzadas (33 semanas) de los ratones tratados con Ad-S1, en comparación con los que recibieron Ad-vacío (**Figura 17**).

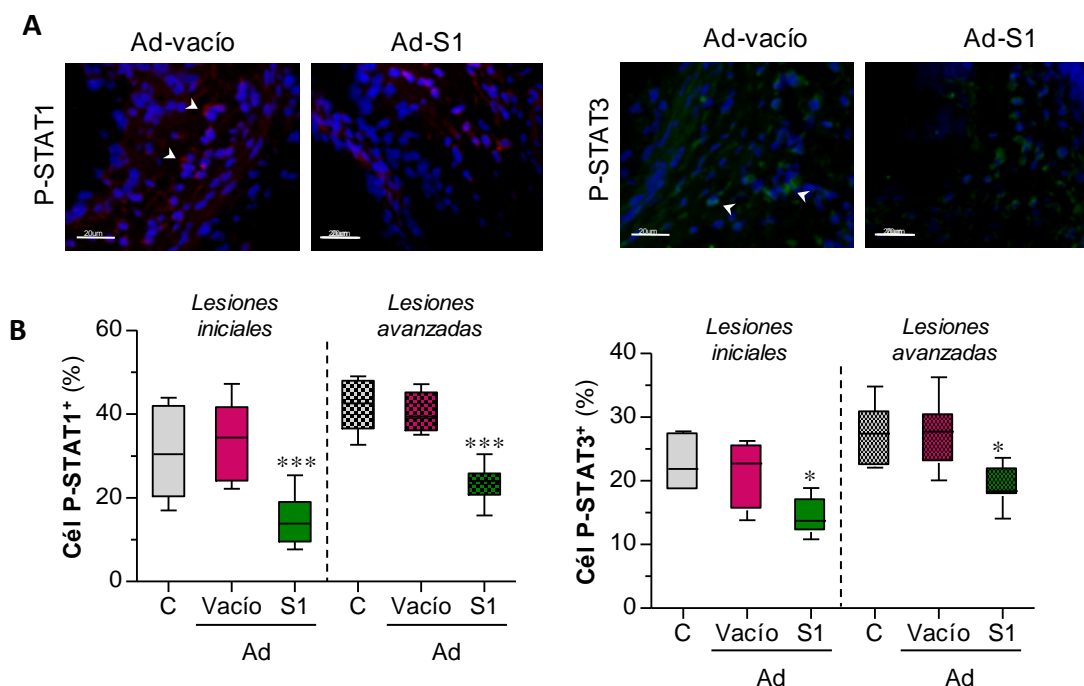


Figura 17. La administración del gen SOCS1 inhibe la activación de STAT en las lesiones ateroscleróticas. (A) Imágenes representativas (ampliación x400) de la inmunofluorescencia de proteínas STAT fosforiladas (rojo, P-STAT1; verde, P-STAT3; azul, tinción nuclear con DAPI) en secciones aórticas de ratones apoE^{-/-} (modelo de lesiones iniciales). Las flechas indican células positivas. **(B)** Diagrama de cajas de la cuantificación de células positivas en lesiones iniciales (13 semanas; n=8-9 ratones por grupo) y avanzadas (33 semanas; n=6-7 ratones por grupo) de ratones control sin tratamiento (C) o tratados con Ad-vacío y Ad-S1. *P<0.05 y ***P<0.001 vs Ad-vacío.

Para cuantificar la aterosclerosis se midió el área de la lesión aterosclerótica tanto en la aorta completa (*en face*) como en cortes transversales seriados de la raíz aórtica. En el modelo de lesiones iniciales (ratones de 8 semanas de edad alimentados durante 5 semanas con dieta hiperlipídica), la transferencia del gen SOCS1 redujo significativamente la formación de placas de ateroma a lo largo de toda la aorta (**Figura 18A**), así como el tamaño (**Figura 18A y C**), la extensión (**Figura 18D**) y el contenido lipídico (**Figura 18E**) de las lesiones ateroscleróticas.

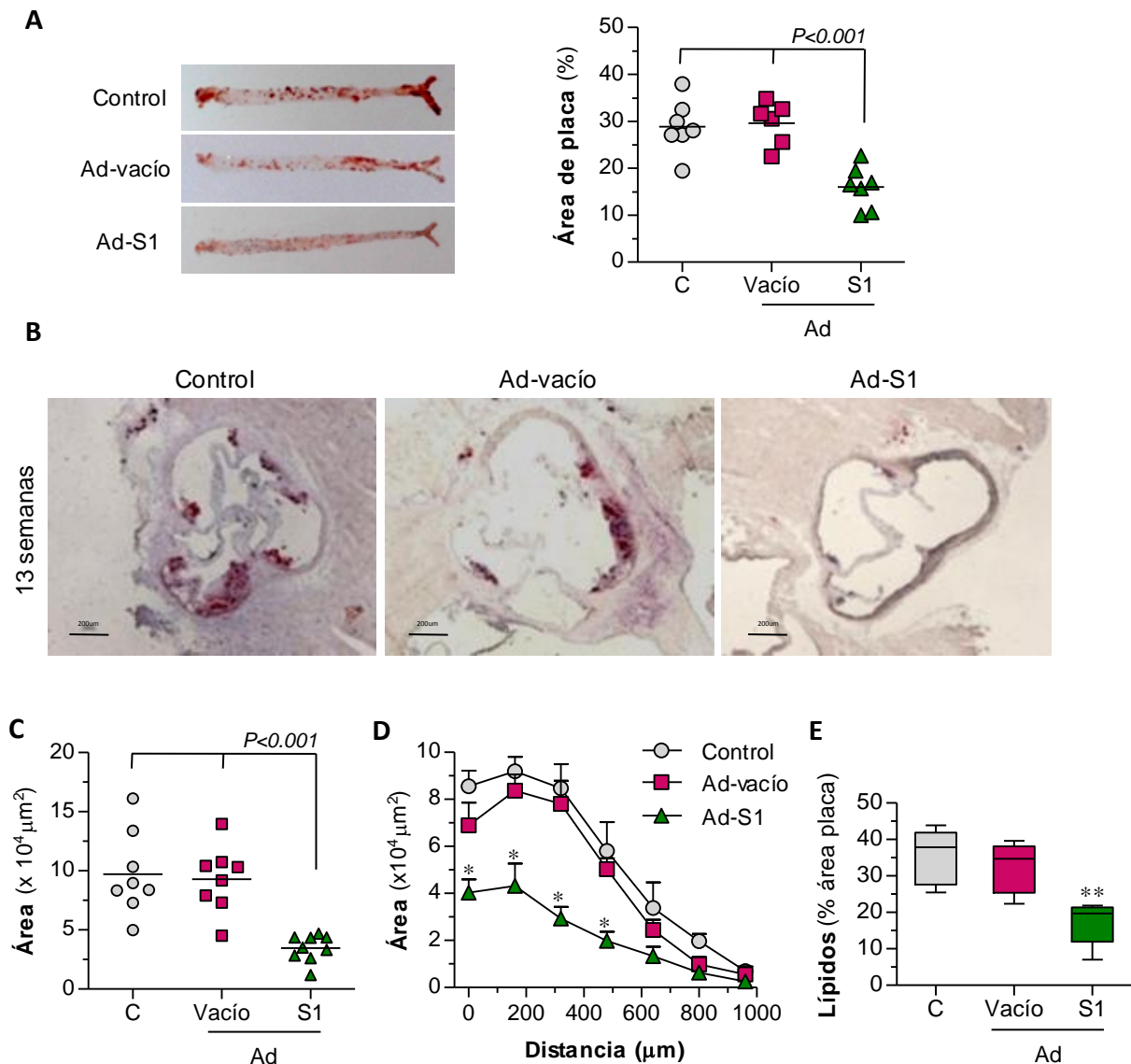


Figura 18. Efecto de la terapia génica con SOCS1 en el desarrollo de aterosclerosis (modelo de lesiones iniciales). (A) Imágenes representativas de la tinción de la aorta *en face* con Sudan IV y cuantificación del tamaño de placas a las 13 semanas de estudio (n=6-8 ratones/grupo). (B) Imágenes representativas (ampliación x40) de secciones del arco aórtico teñidas con Oil-red-O/hematoxilina. (C) Cuantificación del área máxima de la lesión en cada individuo. (D) Media del área de la lesión a lo largo de la raíz aórtica en cada grupo. (E) Cuantificación del contenido lipídico (área Oil-red-O) en las secciones aórticas. Media \pm EEM (n=8-9 ratones/grupo). * $P < 0.05$ y ** $P < 0.01$ vs Ad-vacío.

De igual forma, el análisis de las lesiones avanzadas (ratones de 28 semanas de edad alimentados durante 5 semanas con dieta hiperlipídica) mostró diferencias significativas entre los grupos Ad-S1, Ad-vacío y control en cuanto a los valores de tamaño, extensión y contenido lipídico de las placas (**Figura 19**). Por lo tanto, estos datos sugieren que la terapia génica con SOCS1 es capaz de frenar el inicio y la progresión de la aterosclerosis experimental.

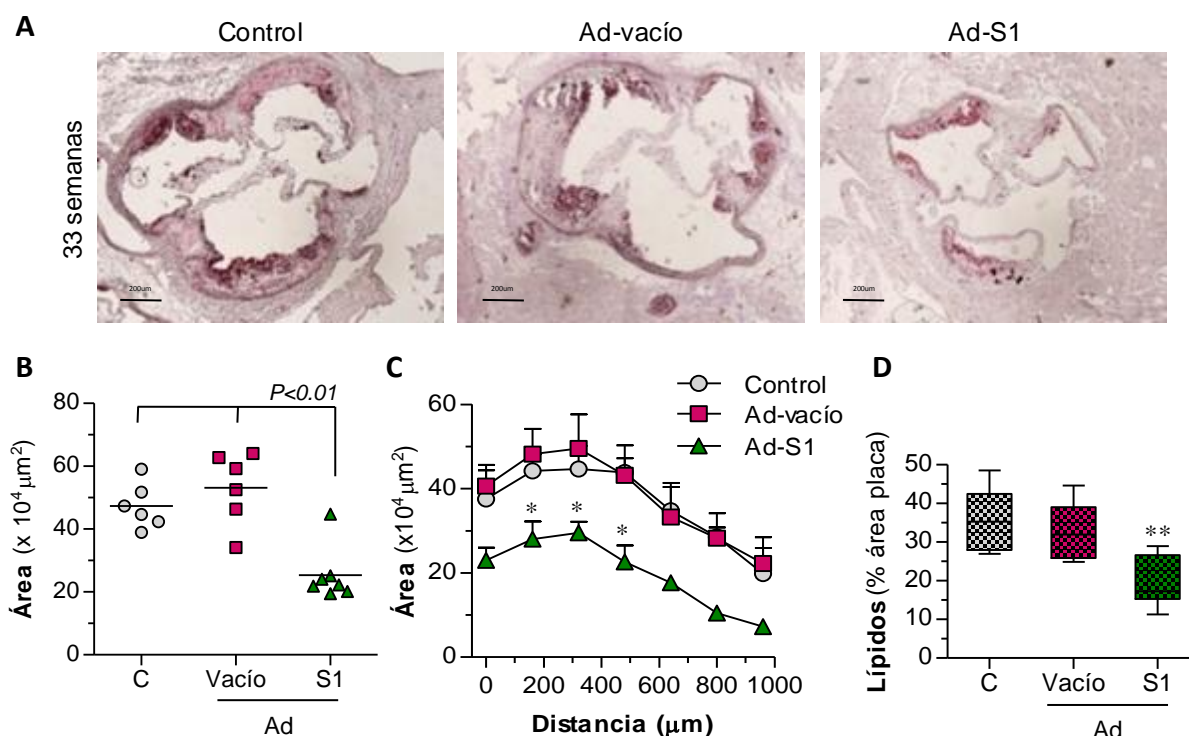


Figura 19. Efecto de la terapia génica con SOCS1 en la progresión de la aterosclerosis (modelo de lesiones avanzadas). (A) Imágenes representativas (ampliación x40) de secciones aórticas teñidas con Oil-red-O/hematoxilina a las 33 semanas de estudio. (B) Cuantificación del área de las lesiones individuales. (C) Media del área de la lesión a lo largo de la aorta en cada grupo. (D) Contenido lipídico (área Oil-red-O). Media \pm EEM (n=6-7 ratones/grupo). *P<0.05 y **P<0.01 vs Ad-vacío.

En ninguno de los dos modelos (lesiones iniciales y avanzadas) se observaron cambios significativos entre las lesiones de los grupos control (no tratado) y Ad-vacío, indicando que la infección adenoviral *per se* no afectó al proceso de aterosclerosis. Tampoco se detectaron variaciones en el peso corporal ni en el perfil lipídico entre los distintos grupos de cada modelo experimental (Tabla 9).

	LESIONES INICIALES (13 semanas)			LESIONES AVANZADAS (33 semanas)		
	Control (n=8)	Ad-vacío (n=8)	Ad-S1 (n=9)	Control (n=6)	Ad-vacío (n=6)	Ad-S1 (n=7)
Peso corporal (g)	22 \pm 2	22 \pm 3	21 \pm 3	32 \pm 4	33 \pm 5	29 \pm 6
Colesterol (mg/dL)	358 \pm 32	337 \pm 31	347 \pm 18	677 \pm 52	650 \pm 67	620 \pm 31
LDL (mg/dL)	330 \pm 28	305 \pm 25	334 \pm 17	621 \pm 55	584 \pm 68	593 \pm 30
HDL (mg/dL)	14.5 \pm 0.9	13.2 \pm 1.5	9.5 \pm 0.7	16.0 \pm 1.3	16.4 \pm 2.3	12.7 \pm 1.2
TG (mg/dL)	92 \pm 8	112 \pm 11	103 \pm 10	99 \pm 7	109 \pm 16	102 \pm 9

Tabla 9. Peso corporal y perfil lipídico de los ratones apoE^{-/-}. Los valores son media \pm EEM del número de animales de cada grupo. No hubo diferencias significativas entre los grupos de cada modelo experimental.

1.2.3. Alteraciones en la composición de la placa aterosclerótica de los ratones tratados con adenovirus SOCS1

La evaluación histológica de las lesiones tempranas demostró una reducción significativa de linfocitos T (CD4) y macrófagos (MOMA-2) en el grupo Ad-S1 en comparación con el control y Ad-vacío (**Figura 20**).

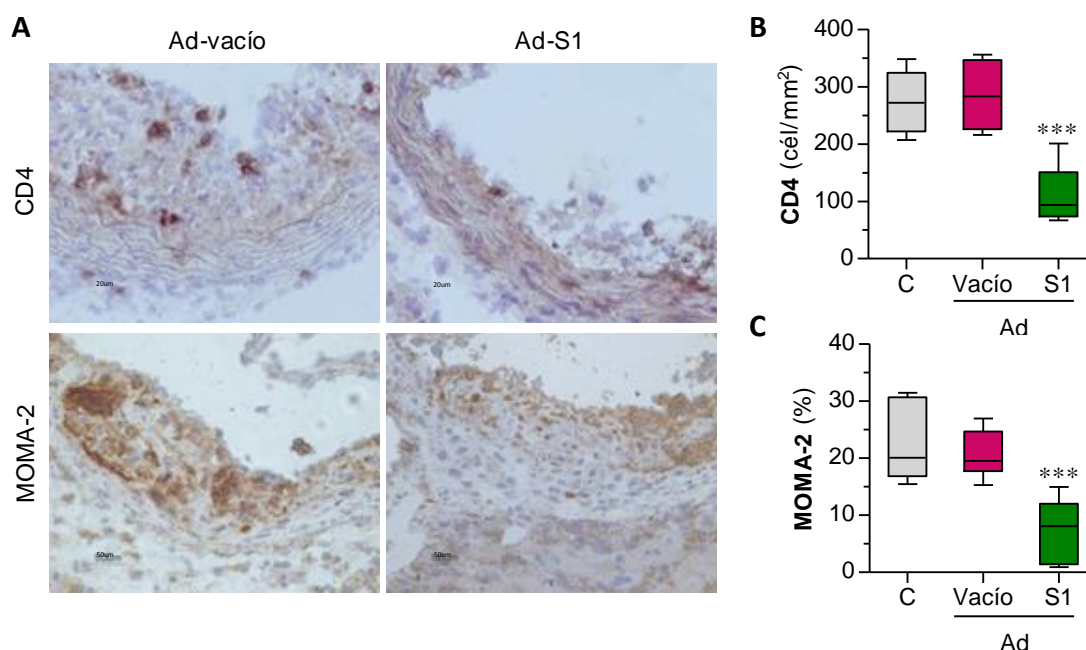


Figura 20. Cambios en la composición de la placa aterosclerótica producidos por la administración del gen SOCS1. (A) Tinciones representativas de CD4 (ampliación x400) y MOMA-2 (ampliación x200) en aorta de ratones del modelo de lesiones iniciales. Análisis cuantitativo del contenido de linfocitos T (B) y macrófagos (C) en las lesiones. Media±EEM (n=8 ratones/grupo). ***P<0.001 vs Ad-vacío.

Además, el análisis de regresión y el cálculo del coeficiente de Pearson (**Figura 21**) mostraron una correlación positiva entre el área de la lesión y la tinción positiva de STAT (P-STAT1 y P-STAT3), CD4 y MOMA-2 en los grupos experimentales, indicando un mayor contenido inflamatorio en las lesiones más grandes. De la misma manera, se observó una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la tinción de P-STAT1 y P-STAT3 en la lesión y algunos parámetros inflamatorios medidos a lo largo del estudio, tales como el contenido de macrófagos y linfocitos en la lesión (**Figura 22**). A la vista de estos resultados, se sugiere que la activación de la vía JAK/STAT es un buen marcador indicativo de la inflamación en la aterosclerosis.

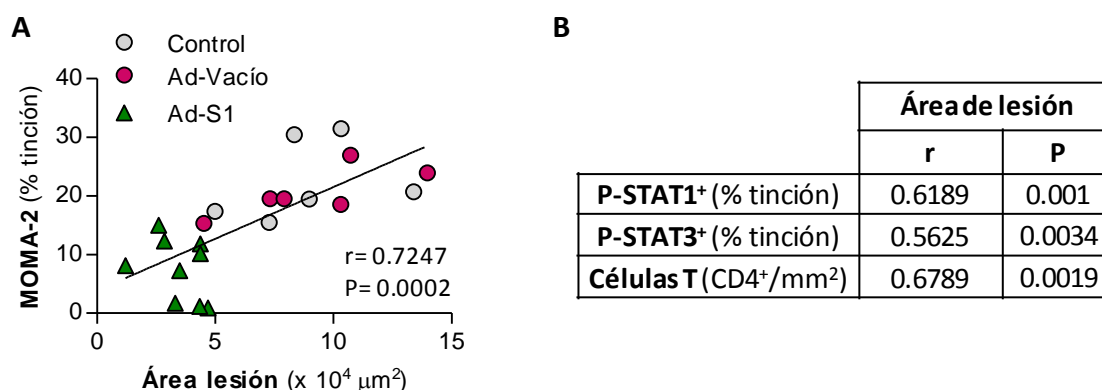


Figura 21. Correlación entre parámetros de las lesiones del modelo de lesiones iniciales. (A) Recta de regresión entre el área de la lesión y el contenido de macrófagos. **(B)** Resumen de los valores de coeficiente de correlación (r) y la significación (P) calculados para otras variables.

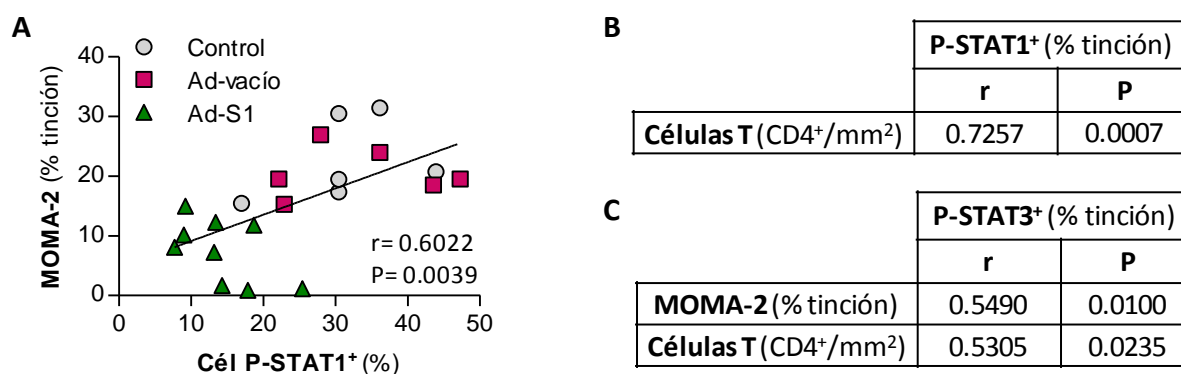


Figura 22. Correlación de los valores de P-STAT1 y P-STAT3 activados con parámetros de inflamación en los ratones del modelo de lesiones iniciales. (A) Recta de regresión entre la tinción P-STAT1 y el contenido de macrófagos en la lesión. Resumen de los valores calculados para otras variables en relación con la tinción P-STAT1 **(B)** y P-STAT3 **(C)**.

La condición estable/vulnerable de la placa de ateroma es un factor de gran importancia en el desarrollo de la aterosclerosis, ya que las principales consecuencias clínicas de la enfermedad ocurren cuando la placa, de carácter inestable, se rompe y da lugar a la formación de trombos que desencadenan eventos como infarto de miocardio o ictus cerebral¹⁴¹. Por ello, en paralelo al componente inflamatorio, se analizó en las lesiones ateroscleróticas la distribución de colágeno, un indicador de estabilidad de la placa. La cuantificación de la tinción con rojo picrosirio demostró que la administración del adenovirus de SOCS1 promueve un fenotipo de la placa más estable, caracterizado por un incremento en el contenido de colágeno (**Figura 23**) y, por consiguiente, una mayor proporción relativa colágeno/lípido (área rojo picrosirio/área Oil-red-O: Control, 0.34 ± 0.07 ; Ad-vacío, 0.39 ± 0.05 ; Ad-S1, 1.20 ± 0.18 , $P < 0.001$ vs Ad-vacío; no mostrado).

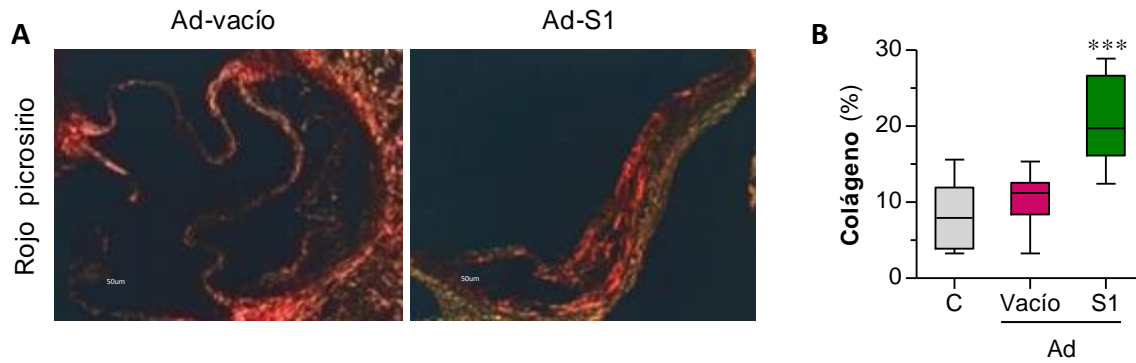


Figura 23. La terapia génica con SOCS1 favorece la estabilidad de las placas ateroscleróticas. (A) Imágenes representativas (aumento x200) de la tinción con rojo picosirio en secciones aórticas (modelo de lesiones iniciales). **(B)** Cuantificación del contenido de colágeno en las lesiones. Media±EEM (n=8 ratones/grupo). ***P<0.001 vs Ad-vacío.

1.2.4. La sobreexpresión de SOCS1 reduce la inflamación vascular y sistémica en los ratones ateroscleróticos

Una vez comprobado que SOCS1 reduce la acumulación de macrófagos intraplaca, se examinó la distribución fenotípica de estas células en las lesiones, empleando como marcadores las isoformas de arginasa. El análisis mediante inmunofluorescencia mostró una expresión mayoritaria de ArgII (marcador M1) en las lesiones de los grupos control y Ad-vacío, mientras que ArgI (marcador M2) predominó en el grupo Ad-S1 (**Figura 24A**). Como consecuencia, la relación M1/M2 se redujo significativamente en el grupo Ad-S1 (**Figura 24B**).

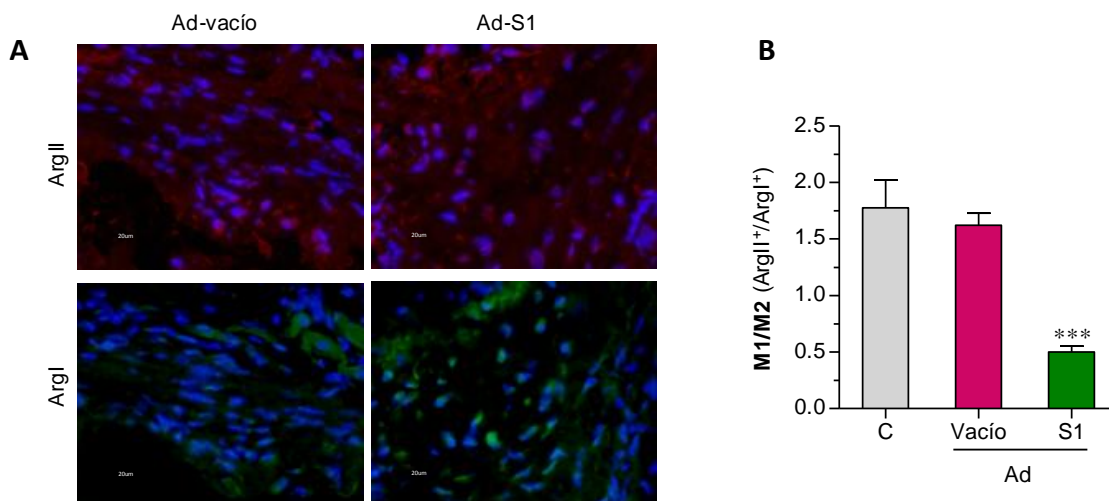


Figura 24. La terapia génica con SOCS1 altera el fenotipo de macrófagos en las placas ateroscleróticas. (A) Imágenes representativas (ampliación x400; rojo, ArgII; verde, ArgI; azul, núcleos) de la inmunofluorescencia de macrófagos M1 (ArgII) y M2 (ArgI) en secciones aórticas (modelo de lesiones tempranas). **(B)** Cuantificación de la proporción relativa de ambos tipos celulares. Media±EEM (n=8 ratones/grupo). ***P<0.001 vs Ad-vacío.

En paralelo se estudió la expresión de CCL2, principal quimioquina implicada en el reclutamiento de monocitos circulantes hacia el interior de la placa de ateroma. Como se observa en la **Figura 25**, la administración del adenovirus SOCS1 redujo significativamente los niveles proteicos de CCL2 en las lesiones. Estos valores de CCL2 correlacionaron positivamente con el área de lesión ($r=0.7365$, $P=0.0003$) y con la tinción positiva de P-STAT1 ($r=0.7279$, $P=0.0004$), pero no de P-STAT3 ($r=0.3493$, $P=0.1427$).

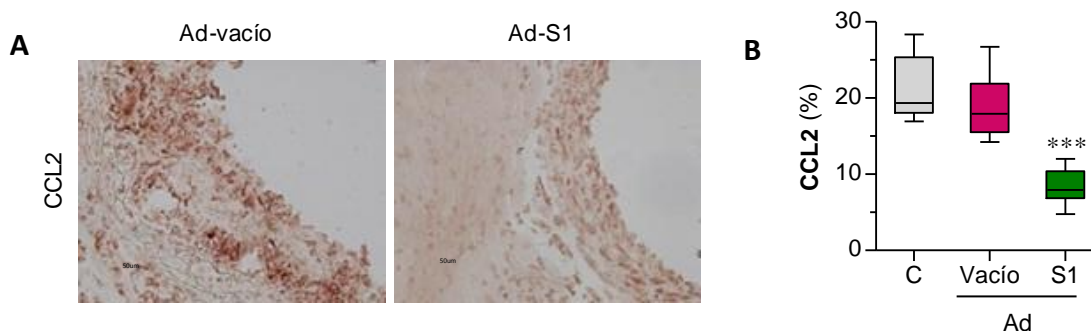


Figura 25. La terapia génica con SOCS1 reduce la expresión de CCL2 en las lesiones ateroscleróticas. (A) Imágenes representativas (ampliación x200) de la tinción inmunoperoxidasa de CCL2 en secciones aórticas del modelo de lesiones tempranas. (B) Cuantificación de la tinción positiva. Media±EEM (n=8 ratones/grupo). ***P<0.001 vs Ad-vacío.

A continuación se evaluó si la ateroprotección mediada por SOCS1 se asociaba con alteraciones en la expresión de genes dependientes de la vía JAK/STAT. El análisis en tejido aórtico mostró una disminución significativa de la expresión de mRNA de quimioquinas y sus receptores (CCL2/CCR2 y CCL5/CCR5), moléculas de adhesión (ICAM-1), citoquinas proinflamatorias (TNF α e IFN γ) y receptores *scavenger* (CD204 y CD36) en los ratones del grupo Ad-S1 en comparación con los grupos control y Ad-vacío (**Figura 26**).

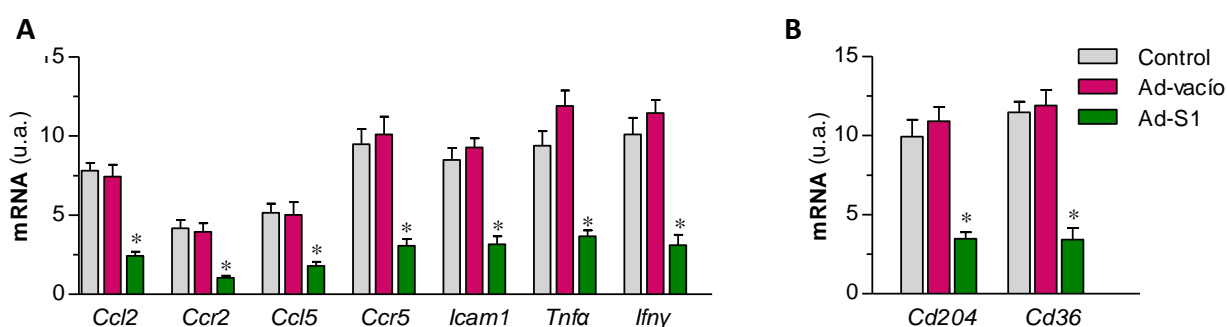


Figura 26. La terapia génica con SOCS1 reduce la expresión de genes en aorta. Análisis mediante PCR a tiempo real de genes inflamatorios (A) y receptores *scavenger* (B) en tejido aórtico (modelo de lesiones tempranas). Los valores normalizados con 18S se expresan en unidades arbitrarias. Media±EEM (n=5-8 ratones/grupo). *P<0.05 vs Ad-vacío.

En último lugar, se estudió el impacto de la terapia génica con SOCS1 en la inflamación sistémica, determinando los niveles de citoquinas y las diferentes poblaciones leucocitarias en el modelo de lesiones tempranas. Como se muestra en la **Figura 27**, la administración del adenovirus SOCS1 redujo la expresión en bazo de citoquinas características de respuesta Th1 (IFN γ) y Th17 (IL-17) y aumentó la expresión de Foxp3, un factor de transcripción implicado en la respuesta Treg. Sin embargo, la respuesta Th2 mediada por IL-4 no se vio alterada significativamente por efecto de SOCS1.

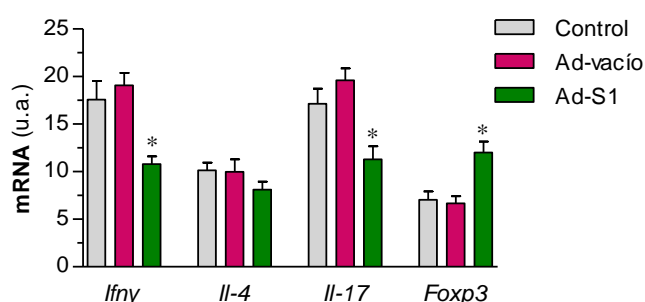


Figura 27. Efecto de SOCS1 en la inflamación sistémica. Análisis mediante PCR a tiempo real de genes de respuesta Th1, Th2, Th17 y Treg en el bazo de ratones apoE^{-/-}. Media \pm EEM (n=5-8 ratones/grupo). *P<0.05 vs Ad-vacío.

El efecto de la administración de SOCS1 en las poblaciones celulares de bazo, médula ósea y sangre se examinó mediante citometría de flujo. No se encontraron diferencias significativas en el número de células B (CD19), células T (CD3 y subtipos CD4 y CD8) y monocitos (CD115) entre los grupos control, Ad-vacío y Ad-S1 (**Figura 28**).

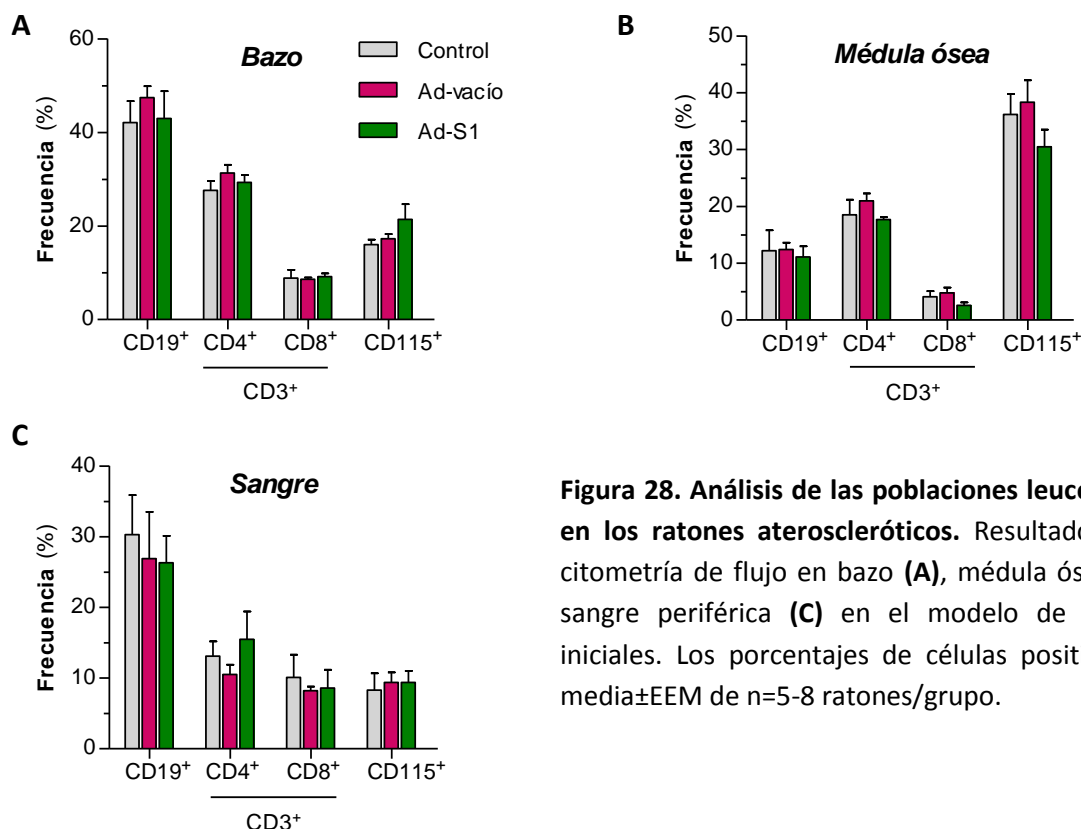


Figura 28. Análisis de las poblaciones leucocitarias en los ratones ateroscleróticos. Resultados de la citometría de flujo en bazo (**A**), médula ósea (**B**) y sangre periférica (**C**) en el modelo de lesiones iniciales. Los porcentajes de células positivas son media \pm EEM de n=5-8 ratones/grupo.

También se evaluaron las subpoblaciones de monocitos empleando el marcador Ly6C para diferenciar entre $CD115^+Ly6C^{alto}$ (más activados y proinflamatorios) y $CD115^+Ly6C^{bajo}$ (menos activados). En comparación con los controles, los ratones del grupo Ad-S1 mostraron una menor frecuencia de monocitos $CD115^+Ly6C^{alto}$ y un aumento del tipo $CD115^+Ly6C^{bajo}$ (**Figura 29**), aunque esta tendencia solo fue significativa en sangre periférica, lo que indica que la administración del gen SOCS1 reduce el estado de activación de los monocitos circulantes.

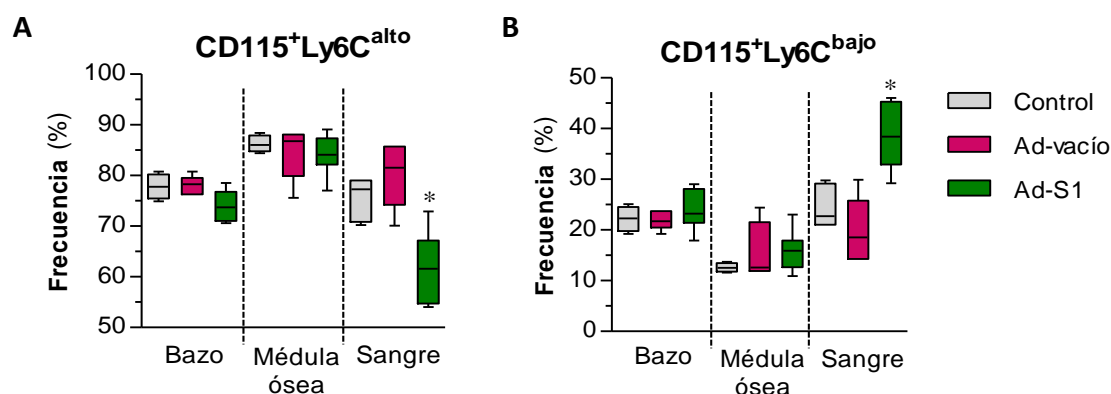


Figura 29. Estudio de las subpoblaciones de monocitos en ratones ateroscleróticos. Resumen de las proporciones de monocitos $CD115^+Ly6C^{alto}$ (**A**) y $CD115^+Ly6C^{bajo}$ (**B**) en muestras de bazo, médula ósea y sangre periférica de los ratones. Los porcentajes de células positivas son media \pm EEM de n=5-8 ratones/grupo. *P<0.05 vs Ad-vacío.

2. DESARROLLO DE UN PÉPTIDO MIMÉTICO DE LA PROTEÍNA SOCS1 PARA EL TRATAMIENTO DE LAS COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA DIABETES

La vía JAK/STAT es un mecanismo por el cual la hiperglucemia y la dislipemia contribuyen a la progresión de las complicaciones vasculares y renales de la diabetes, ya que regula una amplia variedad de genes implicados en procesos de inflamación, proliferación, diferenciación y fibrosis.

Dado el efectivo papel antiinflamatorio y ateroprotector de SOCS1 observado en los estudios de terapia génica, el siguiente paso consistió en desarrollar un nuevo abordaje terapéutico para las complicaciones crónicas de la diabetes, basado en la funcionalidad de la proteína SOCS1, pero empleando otras moléculas más estables y eficientes, los péptidos miméticos. Para ello, se diseñó un péptido sintético cuya secuencia contiene la región KIR de SOCS1 acoplada a una secuencia de permeabilización celular que le permite atravesar la membrana celular, con el fin de inhibir intracelularmente la vía JAK/STAT y las respuestas biológicas activadas en un entorno diabético. Las acciones antiinflamatorias y antifibróticas *in vitro* de este péptido derivado de SOCS1 se estudiaron en cultivos de células vasculares, células renales (mesangiales glomerulares y tubuloepiteliales) y macrófagos estimulados en condiciones inflamatorias. Asimismo, el efecto antiaterosclerótico y renoprotector de la terapia con el péptido SOCS1 se analizó *in vivo* en un modelo experimental de diabetes tipo 1 en ratones hipercolesterolémicos.

2.1. CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DEL PÉPTIDO DERIVADO DE SOCS1

La técnica del dicroísmo circular permite medir la capacidad de moléculas ópticamente activas de absorber diferencialmente la luz polarizada circularmente a izquierda y a derecha, de forma que proporciona información acerca de la estructura secundaria de una molécula biológica en solución, así como los cambios que sufre dicha estructura. Empleamos esta técnica espectroscópica para el análisis estructural del péptido derivado de SOCS1 (sin la región de permeabilización) en presencia de concentraciones crecientes de trifluoroetanol (TFE), un disolvente orgánico ampliamente utilizado en el dicroísmo circular de péptidos y proteínas por su capacidad de simular las condiciones de un sistema *in vivo*¹⁴². En estas condiciones experimentales, observamos que la secuencia péptida sufría un cambio conformacional de estructura *random* a una conformación α -hélice (**Figura 30**), indicando una tendencia del péptido mimético de SOCS1 a adquirir una estructura secundaria ordenada al aproximarse a la bicapa de la membrana celular.

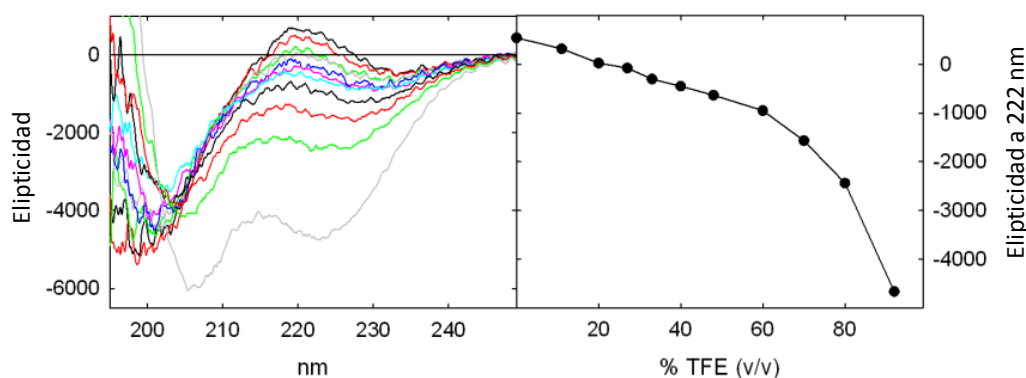


Figura 30. Espectroscopía de dicroísmo circular del péptido derivado de SOCS1. (Panel izquierdo) Espectro de dicroísmo circular en el UV-lejano del péptido SOCS1 en agua y en presencia de diferentes cantidades de TFE (desde 0 hasta 92% v/v). La media de elipticidad del peso de los residuos se expresa en unidades de grados x cm² x dmol⁻¹. **(Panel derecho)** Elipticidad a 222 nm en función de la cantidad de TFE presente.

2.2. EFECTOS *IN VITRO* DEL PÉPTIDO SOCS1

Para evaluar *in vitro* los efectos del péptido mimético de SOCS1 se emplearon cultivos primarios o líneas celulares murinas de algunos de los componentes tisulares más activamente implicados en el inicio y progresión del daño vascular (CMLV) y renal (células tubuloepiteliales (MCT) y mesangiales (MC)). Asimismo, se estudió el impacto del péptido SOCS1 sobre los macrófagos, el tipo de leucocito que mayoritariamente se infiltra en las lesiones y que activa el proceso inflamatorio durante la aterosclerosis y la nefropatía diabética. En estos experimentos, las células quiescentes (24 horas en medio sin SFB) se pretrataron con los péptidos permeables (secuencia inhibidora SOCS1 y su control mutante (MUT)) durante 90 minutos antes de la estimulación con citoquinas inflamatorias (10³ U/mL IFN γ y 10² U/mL IL-6), para evaluar posteriormente el impacto en los genes y respuestas celulares dependientes de JAK/STAT.

2.2.1. Inhibición de la activación de STAT por el péptido SOCS1

Mediante experimentos de fluorescencia comprobamos que tanto las células vasculares (CMLV) como las renales (MCT y MC) son capaces de internalizar el péptido derivado de SOCS1 marcado con rodamina. Además, la preincubación con el péptido SOCS1 inhibió la activación de STAT1 (**Figura 31A**) y STAT3 (**Figura 31B**) y su translocación al núcleo celular inducida por la estimulación con citoquinas en los tres tipos celulares (**Figura 31**).

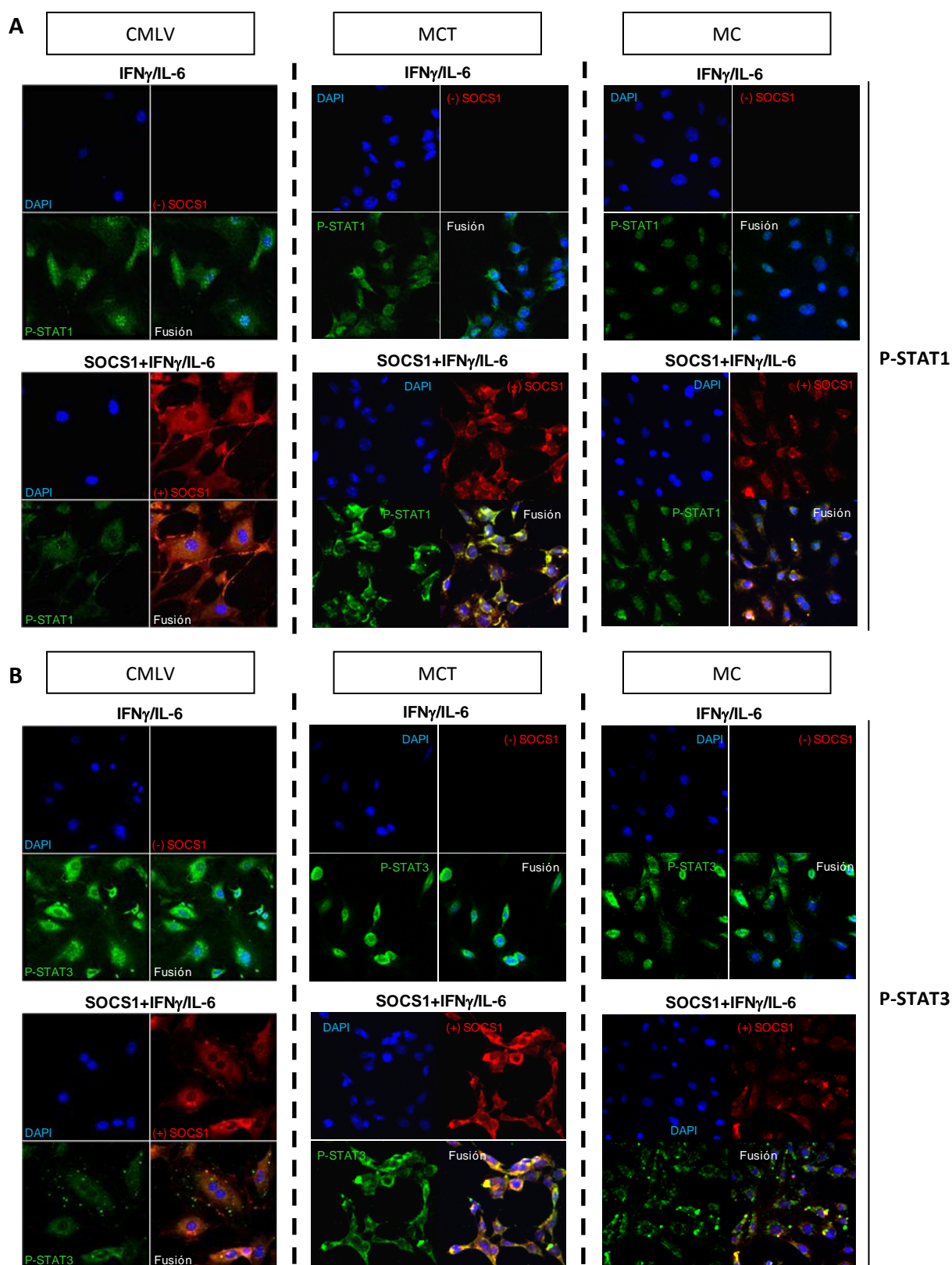


Figura 31. El péptido SOCS1 inhibe la activación de STAT1 y STAT3 en los distintos tipos celulares. Localización de STAT1 (**A**) y STAT3 (**B**) en CMLV, MCT y MC estimuladas con citoquinas (10^3 U/mL IFN γ y 10^2 U/mL IL-6, 60 minutos) en presencia o ausencia del péptido SOCS1 marcado con rodamina (100 μ g/mL). Las imágenes de microscopia confocal (rojo, SOCS1; verde, P-STAT1/P-STAT3; azul, núcleos DAPI) son ilustrativas de 3-4 experimentos independientes.

Para corroborar estos datos, se cuantificó mediante Western blot los niveles de P-STAT1 y P-STAT3 en los extractos totales procedentes de CMLV (**Figura 32A**), macrófagos Raw264.7 (**Figura 32B**), MCT (**Figura 32C**) y MC (**Figura 32D**) estimulados con citoquinas. En todos los tipos celulares, la preincubación con diferentes dosis del péptido SOCS1 redujo la fosforilación de STAT1 y STAT3. Por el contrario, no observamos efectos significativos en presencia del péptido mutante (MUT) empleado como control estructural en los experimentos (**Figura 32**).

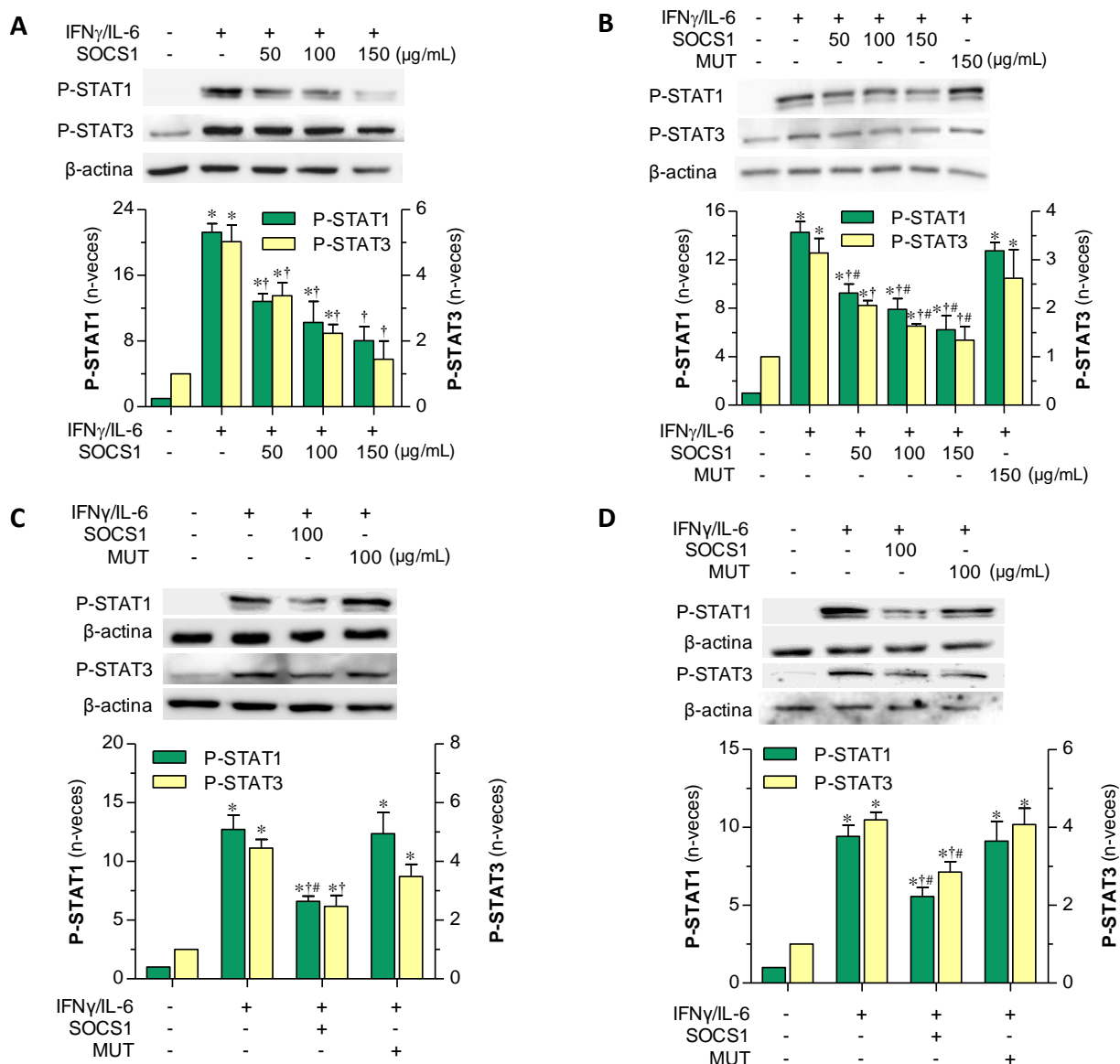


Figura 32. El péptido SOCS1 inhibe la fosforilación de STAT en los distintos tipos celulares. Análisis Western blot en CMLV (**A**), Raw264.7 (**B**), MCT (**C**) y MC (**D**) pretratadas con los péptidos (SOCS1 y MUT, 90 minutos) y estimuladas con citoquinas (IFN γ e IL-6, 60 minutos). Se muestran geles representativos de P-STAT1 y P-STAT3 (β -actina, control de carga) en los extractos totales y el resumen del análisis densitométrico normalizado. Media \pm EEM de 4-6 experimentos independientes. * P <0.05 vs basal; † P <0.05 vs estímulo; # P <0.05 vs mutante.

2.2.2. El péptido SOCS1 inhibe la expresión de genes de inflamación y fibrosis dependientes de la vía JAK/STAT

El análisis por PCR cuantitativa a tiempo real en CMLV y macrófagos Raw264.7 demostró que el péptido SOCS1 era capaz de reducir de forma dosis-dependiente la expresión de CCL2 y CCL5, inducida tras 6 horas de estimulación con citoquinas inflamatorias (**Figura 33A y B**). En ambos tipos celulares, el péptido SOCS1, pero no su secuencia mutada, previno la expresión de otros genes dependientes de JAK/STAT, como TNF α e ICAM-1 (**Figura 33C**). Resultados similares se obtuvieron en cultivos primarios de macrófagos derivados de médula ósea (BMDM) (**Figura 33D**). De forma paralela, el análisis por PCR en las líneas celulares renales MCT y MC mostró que el péptido disminuía la expresión de CCL2, CCL5, CXCL10, TNF α y TGF β , inducida tras 24 horas de estimulación con citoquinas inflamatorias (**Figura 33E y F**).

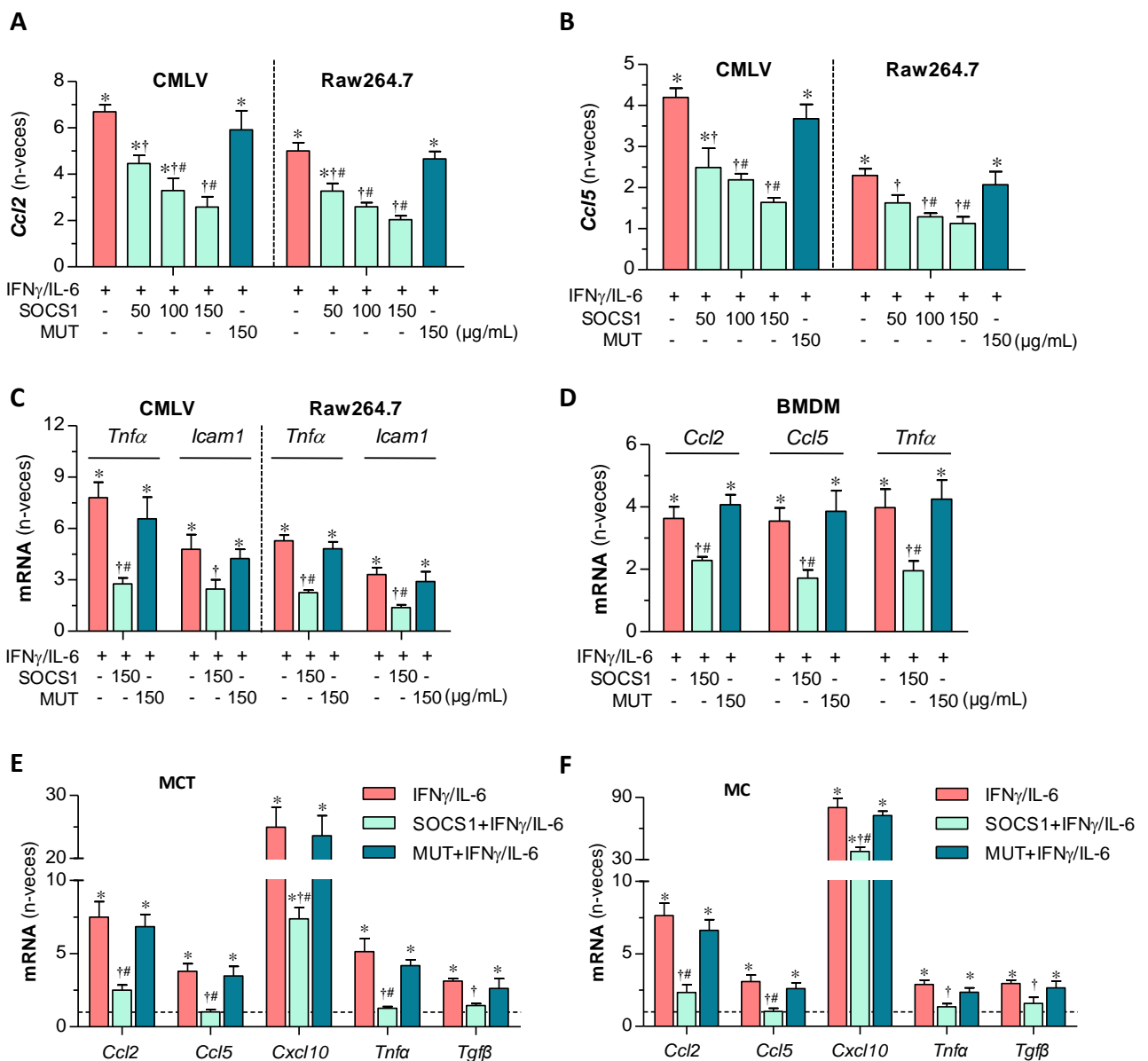


Figura 33 (página anterior). El péptido mimético de SOCS1 inhibe *in vitro* la expresión de genes regulados por JAK/STAT. Expresión de *Ccl2* (A), *Ccl5* (B), *Tnfa* e *Icam-1* (C) en CMLV y Raw264.7 estimuladas con citoquinas (IFN γ e IL-6, 6 horas) y diferentes dosis de péptidos. (D) Efecto de los péptidos SOCS1 y MUT en la expresión génica por los BMDM a 6 horas de estimulación. Expresión de quimioquinas y citoquinas en células tubulares (E) y células mesangiales (F) tras 24 horas de estimulación con IFN γ e IL-6 en presencia de los péptidos SOCS1 y MUT (100 μ g/mL). Los niveles de mRNA, analizados mediante PCR a tiempo real y normalizados con 18S, se expresan como incremento vs basal (indicado por línea discontinua). Media \pm EEM de 3-6 experimentos independientes. *P<0.05 vs basal; †P<0.05 vs estímulo; #P<0.05 vs mutante.

De la misma forma, el péptido SOCS1, pero no la secuencia mutante, previno significativamente la secreción de las quimioquinas CCL2 y CCL5 al medio extracelular, medida por ELISA en los sobrenadantes de CMLV (Figura 34A y D), macrófagos (Figura 34B) y células renales (Figura 34C y E). El péptido SOCS1 también redujo la síntesis y liberación al medio extracelular de la proteína de matriz extracelular fibronectina en MC y MCT (Figura 34F).

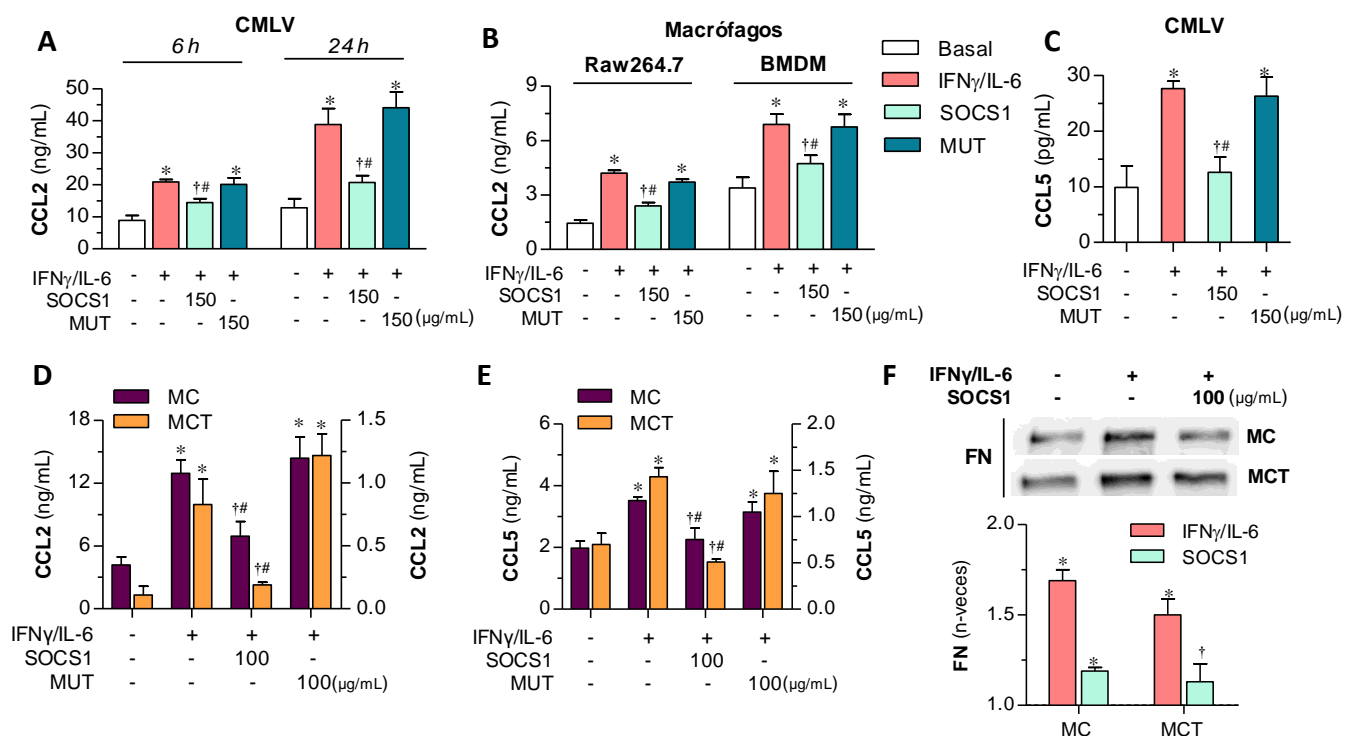


Figura 34. El péptido SOCS1 inhibe la secreción de CCL2, CCL5 y fibronectina. ELISA de CCL2 en los sobrenadantes de CMLV (6 y 24 horas de estimulación con citoquinas, A), macrófagos (6 horas, B) y células renales (MC y MCT, 24 horas, C). ELISA de CCL5 en CMLV (6 horas, E), MC y MCT (24 horas, E). (F) Geles representativos y resumen del análisis densitométrico normalizado de los niveles de fibronectina (FN) en sobrenadantes de MC y MCT. Media \pm EEM de 4-6 experimentos independientes. *P<0.05 vs basal; †P<0.05 vs estímulo; #P<0.05 vs mutante.

2.2.3. Inhibición de la migración y proliferación celular por el péptido SOCS1

El impacto del péptido SOCS1 en la capacidad migratoria de las CMLV se evaluó con dos técnicas diferentes. Los ensayos de *wound healing* en células estimuladas con citoquinas demostraron una mayor capacidad migratoria a lo largo del tiempo en comparación con el basal, así como una reducción de la velocidad de cierre de heridas en presencia del péptido SOCS1 (**Figura 35A y B**). Igualmente, en los ensayos de trans migración en *transwell* observamos que las células tratadas con el péptido SOCS1 mostraban una menor capacidad migratoria en respuesta a la estimulación con citoquinas (**Figura 35C**).

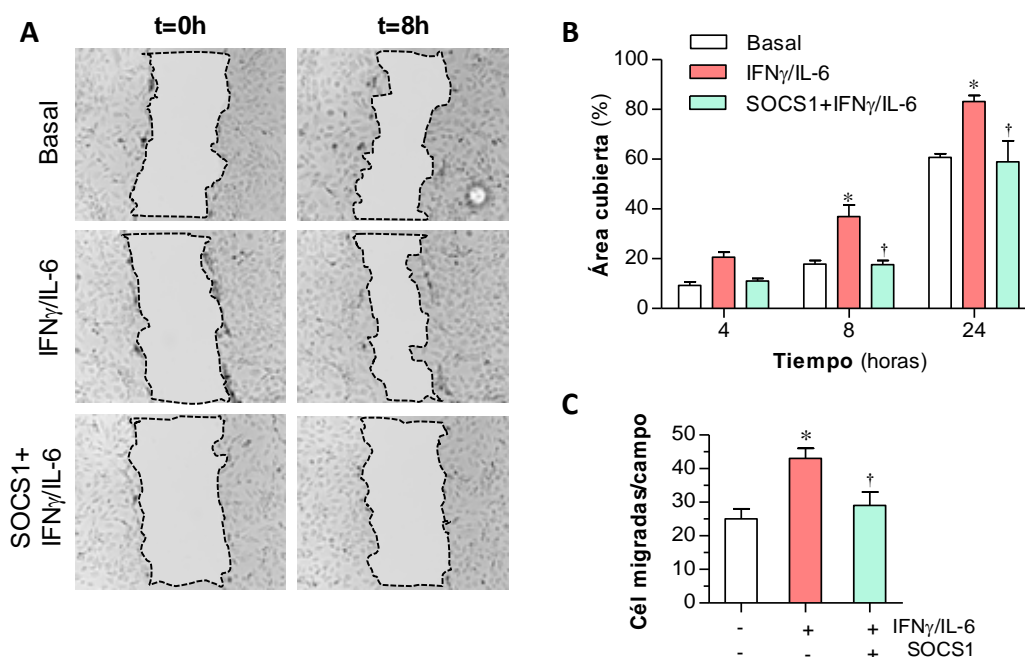


Figura 35. Efectos del péptido mimético de SOCS1 en la migración de CMLV. (A) Fotografías de ensayo de cierre de heridas en CMLV a tiempo inicial y tras 8 horas de estimulación con citoquinas en presencia o ausencia de péptido SOCS1. (B) Cuantificación del área recubierta por células a lo largo del tiempo. (C) Migración de CMLV a través de *transwell* inducida por IFN γ /IL-6. Media \pm EEM (4-6 experimentos). *P<0.05 vs basal; †P<0.05 vs estímulo.

Como ya se ha comentado, en el riñón diabético se produce un incremento de la proliferación y migración de las células mesangiales, lo que disminuye el volumen capilar y la filtración renal. Este proceso de expansión mesangial, junto con la proliferación y diferenciación de las células tubulares son causantes de la hipertrofia renal y otras lesiones críticas en la progresión de la nefropatía. Por ello, investigamos si el péptido SOCS1 era capaz de frenar la migración y proliferación de las células renales. Los estudios de migración (ensayo de cierre de heridas) en CM demostraron que el tratamiento con péptido SOCS1 redujo la capacidad migratoria inducida por las citoquinas IFN γ e IL-6 (**Figura 36**), un efecto

antimigratorio no observado con el péptido mutante. Por otro lado, el péptido SOCS1 inhibió de forma dosis-dependiente la proliferación de MCT inducida por citoquinas (**Figura 37A**). El péptido SOCS1, pero no el mutante, también redujo la proliferación de MC pero no afectó su viabilidad en condiciones basales (**Figura 37B**). Tampoco se observaron efectos en la viabilidad de los demás tipos celulares empleados en este estudio (no mostrado).

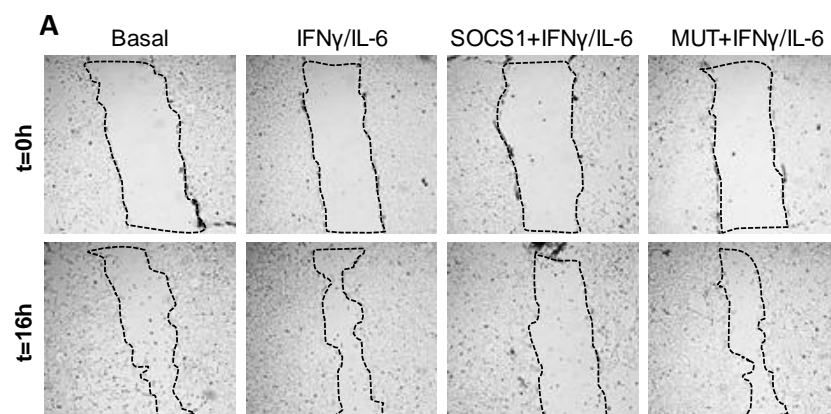


Figura 36. Efecto del péptido SOCS1 en la migración de CM. (A) Fotografías de ensayo de cierre de heridas en MC a tiempo inicial y tras 16 horas de estimulación con citoquinas en presencia o ausencia de péptidos. (B) Cuantificación del porcentaje de área recubierta por células a diferentes tiempos tras la hendidura. Media±EEM (4-6 experimentos). *P<0.05 vs basal; †P<0.05 vs estímulo; #P<0.05 vs mutante.

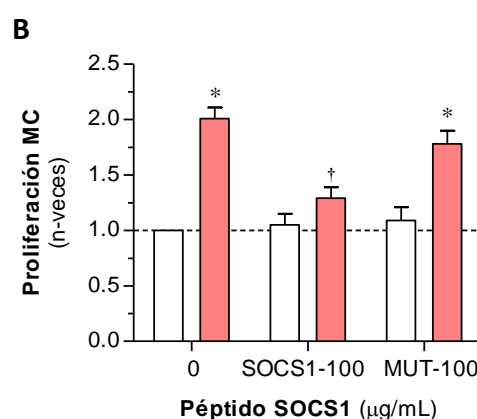
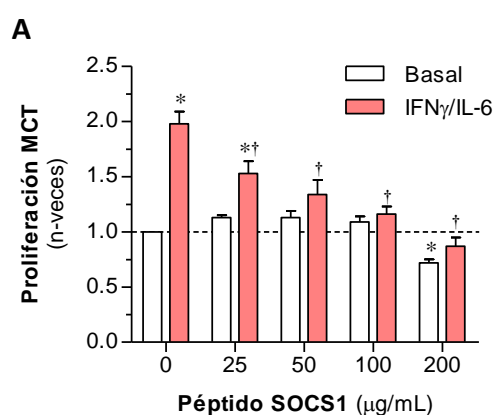
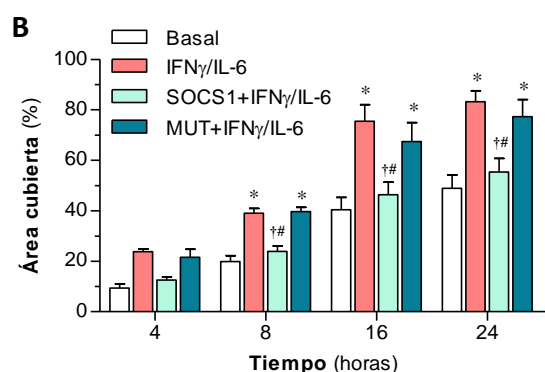


Figura 37. Análisis de la proliferación de células renales en presencia del péptido SOCS1. (A) Ensayo de MTT en MCT (A) y MC (B) incubadas durante 48 horas con citoquinas en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de péptidos (SOCS1 y MUT). Media±EEM (3-5 experimentos). La línea discontinua indica el valor basal sin péptido. *P<0.05 vs basal; †P<0.05 vs estímulo.

2.2.4. El péptido SOCS1 regula la adhesión y polarización de los macrófagos

La adhesión de los monocitos circulantes al endotelio y su migración hacia la íntima de la lesión aterosclerótica, así como su posterior diferenciación y polarización a macrófagos de distinto fenotipo constituyen procesos clave en el desarrollo de la placa de ateroma. Igualmente, los macrófagos participan activamente en la progresión de la nefropatía diabética, ya que su reclutamiento, polarización y acumulación en los compartimentos glomerular e intersticial promueven procesos de inflamación y fibrosis renal.

Por ello, analizamos en primer lugar la capacidad de adhesión de macrófagos Raw264.7 a las CMLV activadas con citoquinas. El pretratamiento con el péptido SOCS1 disminuyó la adhesión de macrófagos a la monocapa de CMLV (**Figura 38A**), probablemente correlacionado con la menor expresión de moléculas de adhesión y quimioquinas determinada anteriormente mediante PCR y ELISA (ver **Figuras 33 y 34**).

A continuación se evaluó el impacto del péptido mimético de SOCS1 sobre el fenotipo y funcionamiento de los macrófagos, mediante PCR (**Figura 38B**) y Western blot (**Figura 38C**) de las isoformas de arginasa, como marcadores de macrófagos proinflamatorios M1 (ArgII) y antiinflamatorios M2 (ArgI). En las células derivadas de médula ósea (BMDM), la estimulación con IFN γ e IL-6 indujo un incremento en la expresión relativa de ArgII/ArgI, indicativo de la polarización M1. Esta tendencia a fenotipo proinflamatorio se redujo significativamente en las células tratadas con péptido SOCS1, mientras que la secuencia mutada no tuvo ningún efecto.

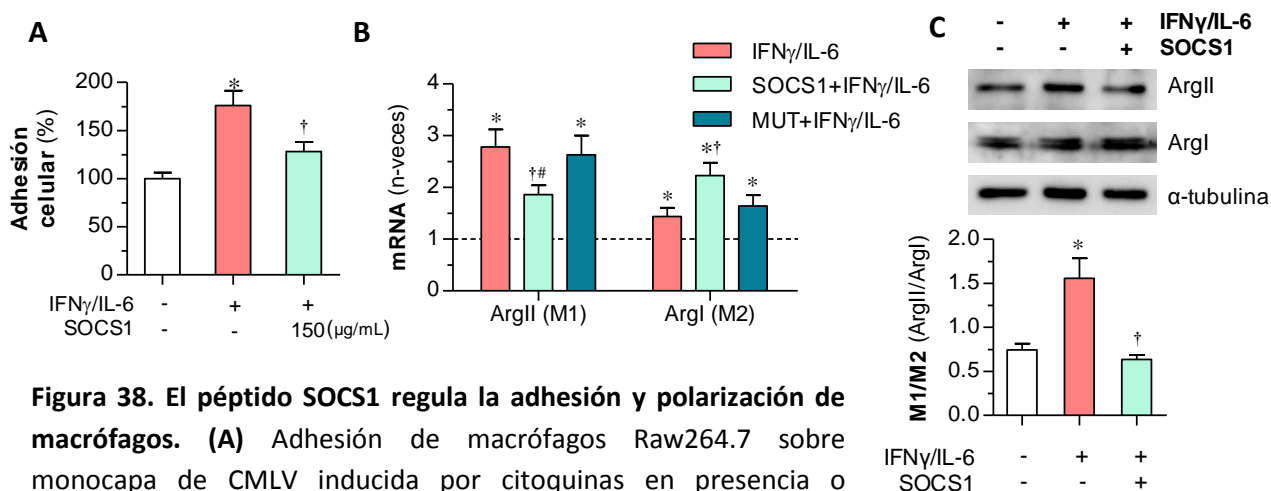


Figura 38. El péptido SOCS1 regula la adhesión y polarización de macrófagos. (A) Adhesión de macrófagos Raw264.7 sobre monocapa de CMLV inducida por citoquinas en presencia o ausencia del péptido SOCS1. (B) Análisis mediante PCR a tiempo real de la expresión de ArgII y ArgI en BMDM a las 6 horas de estimulación. Los valores normalizados con el control endógeno 18S se expresan como incremento vs basal (indicado por línea discontinua). (C) Análisis Western blot de la expresión proteica de ArgII y ArgI (α -tubulina, control de carga) en BMDM. Geles representativos y resumen de los datos densitométricos expresados como relación M1/M2. Media \pm EEM (4-6 experimentos). *P<0.05 vs basal; †P<0.05 vs estímulo; #P<0.05 vs mutante.

2.2.5. El péptido SOCS1 regula los niveles de ROS en células del vaso

La generación de ROS a nivel vascular se produce principalmente por activación de la enzima NADPH oxidasa, cuya expresión y actividad puede ser inducida por citoquinas y otros factores aterogénicos en las células endoteliales, CMLV y monocitos/macrófagos de las lesiones. Por ello, en primer lugar examinamos la producción de anión superóxido en las CMLV mediante tinción con DHE, un compuesto que atraviesa la membrana celular y emite fluorescencia al ser oxidado por ROS. Como se observa en la **Figura 39**, la fluorescencia de DHE inducida por la estimulación con citoquinas se redujo en presencia del péptido SOCS1, lo que indica un efecto antioxidante.

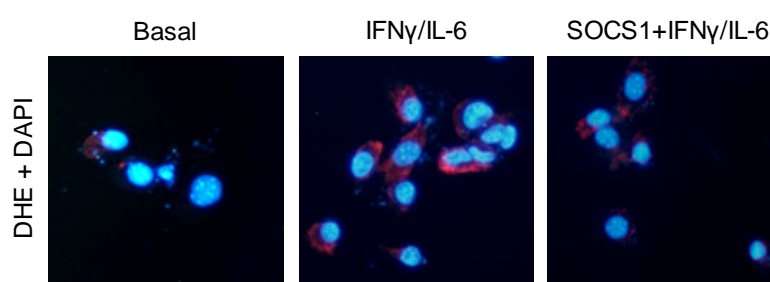


Figura 39. Producción de O_2^- en CMLV. Imágenes representativas (n= 3) de la tinción con DHE en CMLV que muestran una intensa fluorescencia roja después de 3 horas de estimulación con citoquinas y un descenso en presencia del péptido SOCS1 (DHE, rojo; DAPI, azul).

En otros experimentos determinamos el efecto del péptido SOCS1 en la regulación de la actividad de la enzima NADPH oxidasa en CMLV (**Figura 40A**) y macrófagos (Raw264.7 y BMDM; **Figura 40B y C**) mediante ensayo de quimioluminiscencia con lucigenina. En los tres tipos celulares, la estimulación con citoquinas aumentó rápidamente la generación de ROS dependiente de NADPH oxidasa, que se mantuvo incluso a tiempos más largos de incubación. Además, la preincubación con el péptido SOCS1 o con apocinina (inhibidor selectivo de NADPH oxidasa) redujo significativamente la producción de ROS a todos los tiempos.

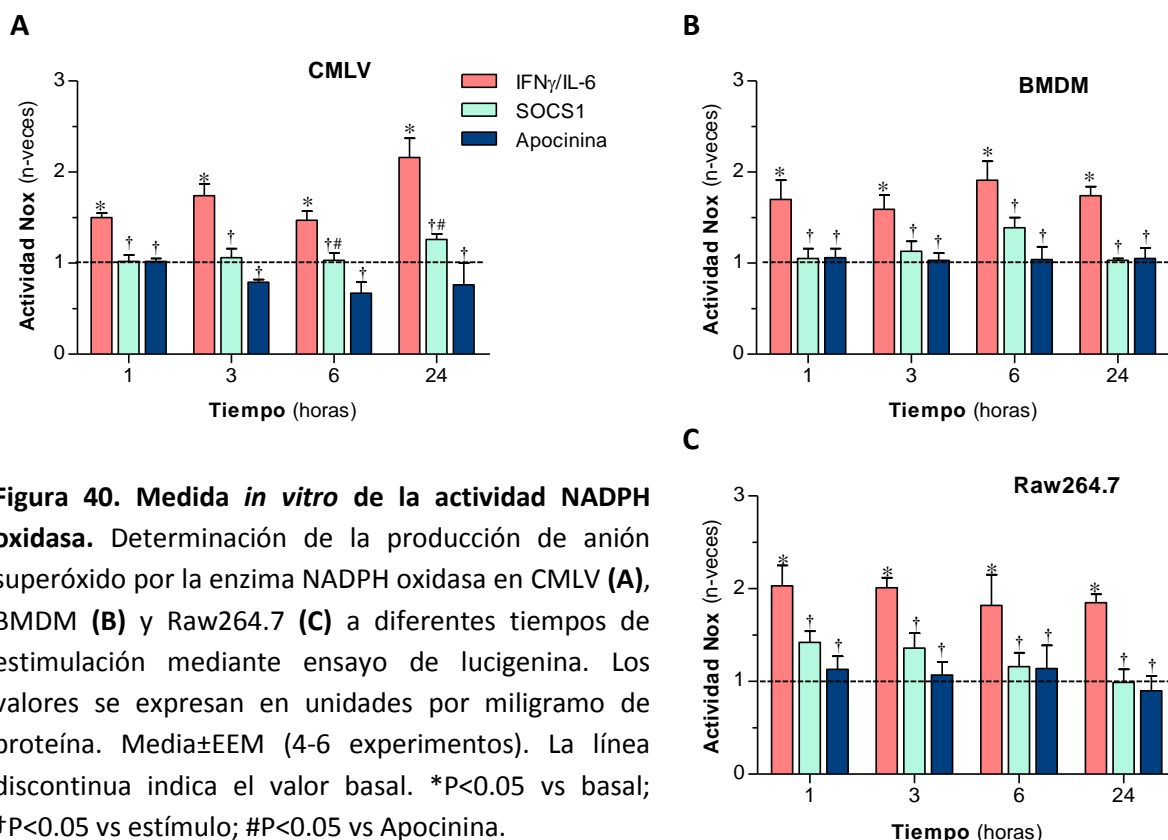


Figura 40. Medida *in vitro* de la actividad NADPH oxidasa. Determinación de la producción de anión superóxido por la enzima NADPH oxidasa en CMLV (A), BMDM (B) y Raw264.7 (C) a diferentes tiempos de estimulación mediante ensayo de lucigenina. Los valores se expresan en unidades por miligramo de proteína. Media \pm EEM (4-6 experimentos). La línea discontinua indica el valor basal. *P<0.05 vs basal; †P<0.05 vs estímulo; #P<0.05 vs Apocinina.

Por último, evaluamos la expresión génica de las principales subunidades que conforman el complejo de la enzima NADPH oxidasa. El análisis mediante PCR cuantitativa mostró diferentes cinéticas de expresión de las subunidades Nox, de manera que Nox1 (Figura 41A) aumentó de forma progresiva tras la estimulación con citoquinas, mientras que Nox4 (Figura 41B) y NoxA1 (Figura 41C) presentaron un pico máximo de expresión a las 16 y 6 horas de incubación, respectivamente. Además, el pretratamiento con el péptido SOCS1 disminuyó la expresión de las tres subunidades inducibles (Nox1, Nox4 y NoxA1; Figura 41A-C). No se detectaron cambios en las subunidades NoxO1 (Figura 41D) y p22phox (Figura 41E). De forma análoga, los estudios en BMDM demostraron que la incubación con citoquinas inducía la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa fagocítica (Nox2, p47phox y p67phox) y este efecto se redujo significativamente en presencia del péptido SOCS1 (Figura 42).

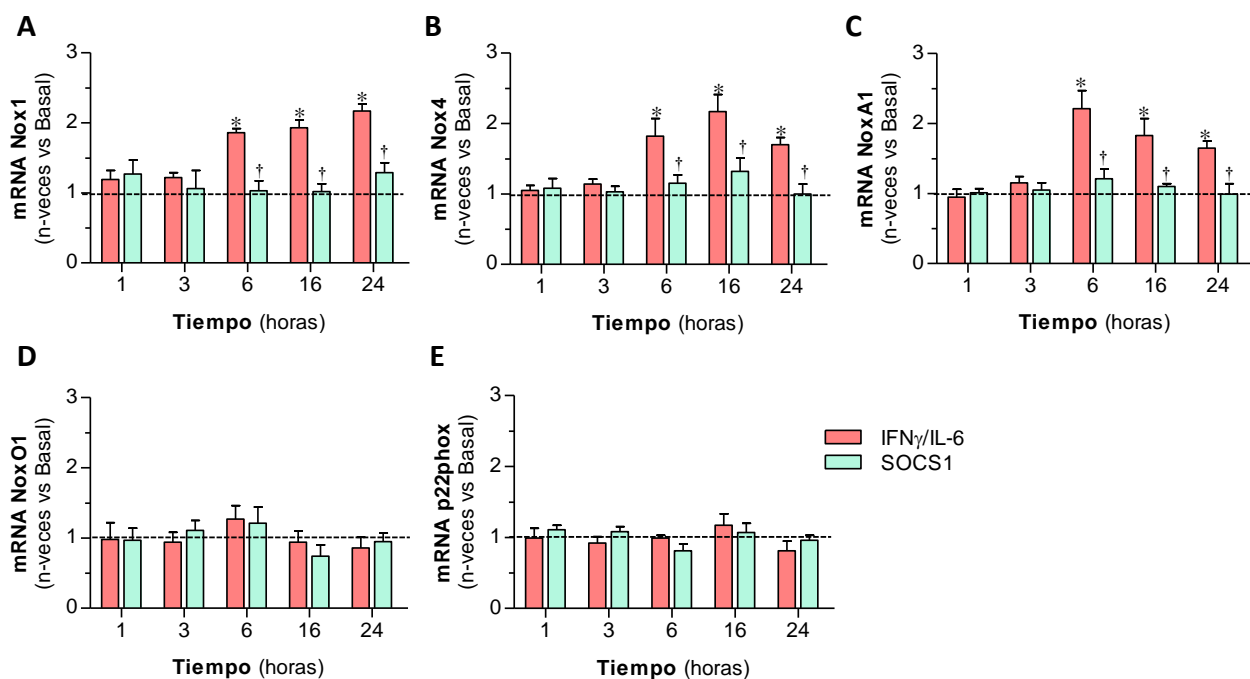


Figura 41. Efecto del péptido SOCS1 en la expresión de las subunidades de la NADPH oxidasa en CMLV. Expresión de *Nox1* (A), *Nox4* (B), *NoxA1* (C), *NoxO1* (D) y *p22phox* (E) en CMLV pretratadas con el péptido SOCS1 y estimuladas con citoquinas a los tiempos indicados. Los niveles de mRNA, analizados por PCR a tiempo real y normalizados con 18S, se expresan como incremento vs basal (indicado por línea discontinua). Los datos son media \pm EEM de 3-6 experimentos independientes. *P<0.05 vs basal; †P<0.05 vs estímulo.

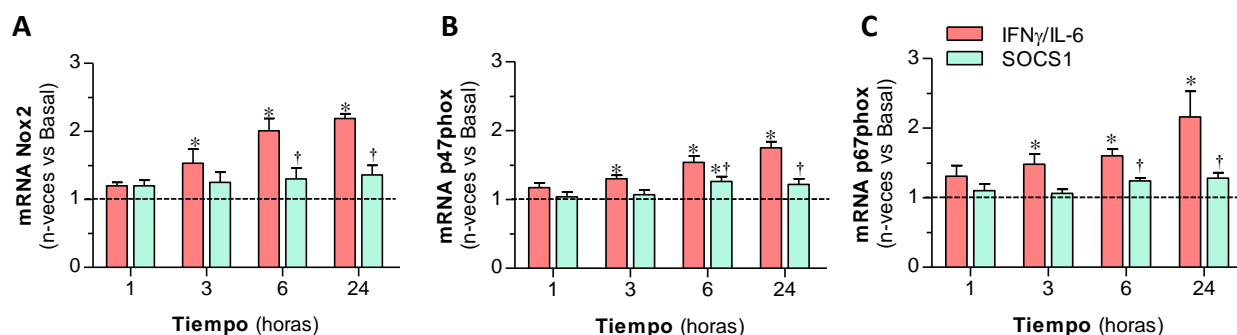


Figura 42. El péptido SOCS1 inhibe la expresión de la NADPH oxidasa fagocítica. Expresión de *Nox2* (A), *p47phox* (B) y *p67phox* (C) en BMDM incubados con IFN γ e IL-6 en presencia del péptido SOCS1. Los niveles de mRNA, analizados mediante PCR a tiempo real y normalizados con 18S, se expresan como incremento vs basal (indicado por línea discontinua). Media \pm EEM de 3-6 experimentos independientes. *P<0.05 vs basal; †P<0.05 vs estímulo.

2.3. EFECTOS *IN VIVO* DEL PÉPTIDO SOCS1 EN LA ATEROSCLEROSIS Y LA NEFROPATÍA ASOCIADAS A DIABETES

Una vez comprobada la capacidad del péptido SOCS1 de inhibir las respuestas biológicas mediadas por la vía JAK/STAT en las células vasculares y renales, se procedió a analizar *in vivo* el posible efecto antiinflamatorio, antiaterosclerótico y renoprotector de la terapia basada en este péptido mimético. Como aproximación experimental empleamos un modelo de diabetes tipo 1 inducida por STZ en ratones apoE^{-/-}. Varios grupos incluido el nuestro^{143,144} han descrito previamente que la combinación de hiperglucemia e hiperlipidemia, dos importantes factores de riesgo cardiovascular, acelera considerablemente el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en estos ratones apoE^{-/-}.

2.3.1. Distribución del péptido SOCS1 en los tejidos

En primer lugar se comprobó, mediante microscopía de fluorescencia *ex vivo* con SOCS1 marcado con rodamina, si el péptido permeable inyectado por vía intraperitoneal (3.25 µg/g de peso) llegaba de forma efectiva a los tejidos diana, en este caso la aorta y el riñón de los ratones apoE^{-/-}. Se pudo observar una acumulación del péptido SOCS1 marcado en las placas aórticas de los ratones, mayoritariamente a las 3 y 6 horas tras su inyección (**Figura 43**). Además, los estudios de colocalización mostraron una mayor captación del péptido marcado en las zonas ricas en macrófagos (**Figura 43A**).

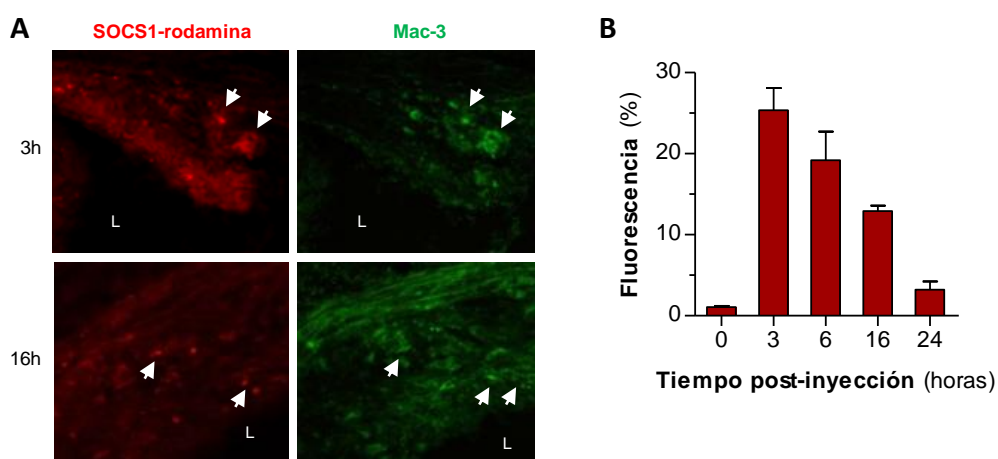


Figura 43. Distribución del péptido SOCS1 fluorescente en el tejido aórtico de ratones apoE^{-/-}. (A) Imágenes representativas (ampliación x200; L, indica el lumen) de secciones aórticas consecutivas que muestran la distribución del péptido SOCS1 marcado con rodamina (rojo) y la localización de macrófagos (Mac-3, verde) después de 3 y 16 horas de la inyección del péptido. Las flechas indican células positivas. (B) Cuantificación de la fluorescencia de SOCS1 en la aorta de los ratones a lo largo del tiempo (n=3).

De la misma forma, se observó que el péptido SOCS1 marcado con rodamina llegaba de forma efectiva a los riñones de los ratones apoE^{-/-} diabéticos, con un pico máximo de acumulación a las 16 horas (**Figura 44**).

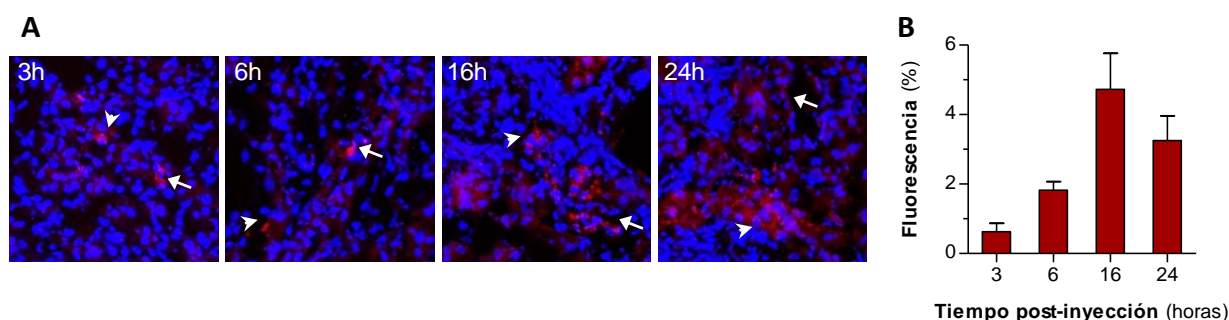


Figura 44. Localización renal del péptido mimético de SOCS1 marcado con rodamina. (A) Imágenes representativas (ampliación x200) de microscopía fluorescente de secciones de tejido renal que muestran la distribución del péptido SOCS1 marcado con rodamina en glomérulos (flecha) y túbulos (punta de flecha). En azul los núcleos teñidos con DAPI. **(B)** Cuantificación de la fluorescencia de SOCS1 en las muestras de riñón a lo largo del tiempo (n=3).

2.3.2. Evolución del modelo de diabetes experimental en ratones apoE^{-/-}

En estos estudios se utilizaron ratones de 8 y 22 semanas de edad que, tras 2 semanas de inducción de diabetes (glucemia >350mg/dL), fueron divididos en los siguientes grupos de tratamiento (ver esquema de ambos modelos en la **Figura 10**, página 32):

- **Modelo de lesiones iniciales (8 semanas edad):** Grupo de referencia (n=8), tratados con vehículo (0.1% DMSO, n=19) y tratados con el péptido SOCS1 (3.25 µg/g de peso, n=18). El grupo de referencia se sacrificó a las 2 semanas tras la inducción de diabetes y los demás grupos se sacrificaron a las 6 y 10 semanas de tratamiento.
- **Modelo de lesiones avanzadas (22 semanas edad):** tratados con vehículo (n=10), péptido SOCS1 (n=10) o péptido mutado MUT (3.25 µg/g de peso, n=8) y sacrificados a las 10 semanas de tratamiento.

Como grupo control se emplearon ratones normoglucémicos (n=5).

En primer lugar, se analizaron los parámetros bioquímicos y metabólicos de los ratones en ambas fases del modelo experimental (lesiones iniciales y avanzadas). Las curvas de evolución de glucemia a lo largo del estudio fueron similares en todos los grupos diabéticos (**Figura 45**).

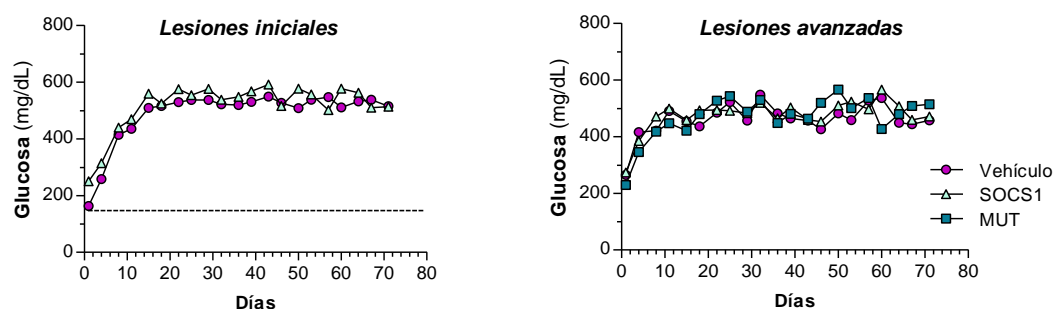


Figura 45. Evolución de la glucemia en los modelos. Niveles de glucosa en sangre de ratones diabéticos tratados con vehículo, péptido SOCS1 o MUT a lo largo del periodo de estudio. Se representa el valor medio de cada grupo diabético (puntos) y del grupo normoglucémico (línea discontinua).

Al finalizar el modelo, se comprobó que el tratamiento con SOCS1 no alteró la hiperglucemia (glucosa y GHbA1c), el peso corporal ni el perfil lipídico de los ratones diabéticos, ya que no hubo diferencias significativas entre los grupos de tratamiento en ambos modelos (**Tabla 10**). Tampoco se detectaron cambios significativos en los niveles séricos de las transaminasas hepáticas (ALT y AST; **Tabla 10**), entre los grupos que recibieron vehículo y los tratados con los péptidos SOCS1 o MUT, lo que sugiere una baja toxicidad de los péptidos a la dosis empleada.

	Lesiones iniciales			Lesiones avanzadas		
	No diabético	Vehículo	SOCS1	Vehículo	SOCS1	MUT
Δ Peso (final-inicial, g)	3.2 \pm 0.2	-(2.3 \pm 0.5)***	-(2.0 \pm 0.3) ***	-(2.8 \pm 0.6) ***	-(2.3 \pm 0.5) ***	-(2.6 \pm 0.2) ***
Glucosa (mg/dL)	158 \pm 10	528 \pm 12***	549 \pm 29***	495 \pm 16***	504 \pm 17***	517 \pm 16***
GHbA1c (μ g/mL)	120 \pm 5	490 \pm 37***	504 \pm 45***	522 \pm 5***	510 \pm 14***	515 \pm 18***
Colesterol (mg/dL)	328 \pm 19	583 \pm 19***	611 \pm 59***	856 \pm 80***	825 \pm 94***	866 \pm 23***
LDL (mg/dL)	309 \pm 8	557 \pm 19***	597 \pm 61***	817 \pm 106***	773 \pm 96***	821 \pm 22***
HDL (mg/dL)	13 \pm 1	12 \pm 1	11 \pm 1	19 \pm 2	20 \pm 2*	21 \pm 1*
TG (mg/dL)	54 \pm 9	72 \pm 5	89 \pm 23	133 \pm 17**	123 \pm 19*	119 \pm 5***
ALT (IU/L)	111 \pm 12	106 \pm 6	97 \pm 17	87 \pm 16	89 \pm 16	78 \pm 9*
AST (IU/L)	176 \pm 18	226 \pm 16	176 \pm 20	181 \pm 20	159 \pm 20	171 \pm 17

Tabla 10. Parámetros bioquímicos de ratones no diabéticos y diabéticos después de 10 semanas de tratamiento. Los resultados son media \pm EEM del total de animales por grupo. *P<0.05 **P<0.01***P<0.001 vs no diabéticos. *Abreviaturas:* GHbA1c, hemoglobina glicosilada; TG, triglicéridos; ALT, alanina aminotransferasa; AST, aspartato aminotransferasa.

2.3.3. El tratamiento con el péptido SOCS1 bloquea la activación de JAK/STAT en las placas ateroscleróticas de ratones diabéticos

Para comprobar la efectividad del péptido SOCS1 como inhibidor *in vivo* de la activación de la vía JAK/STAT, se analizó mediante inmunofluorescencia la fosforilación de las proteínas STAT1 y STAT3 en las aortas de ratones diabéticos (modelo de lesiones iniciales) (**Figura 46A**). La cuantificación del número de núcleos positivos concluyó que las lesiones ateroscleróticas de ratones tratados durante 10 semanas con SOCS1 presentaban una menor activación de STAT1 y STAT3 en comparación con el grupo tratado con vehículo (**Figura 46B**).

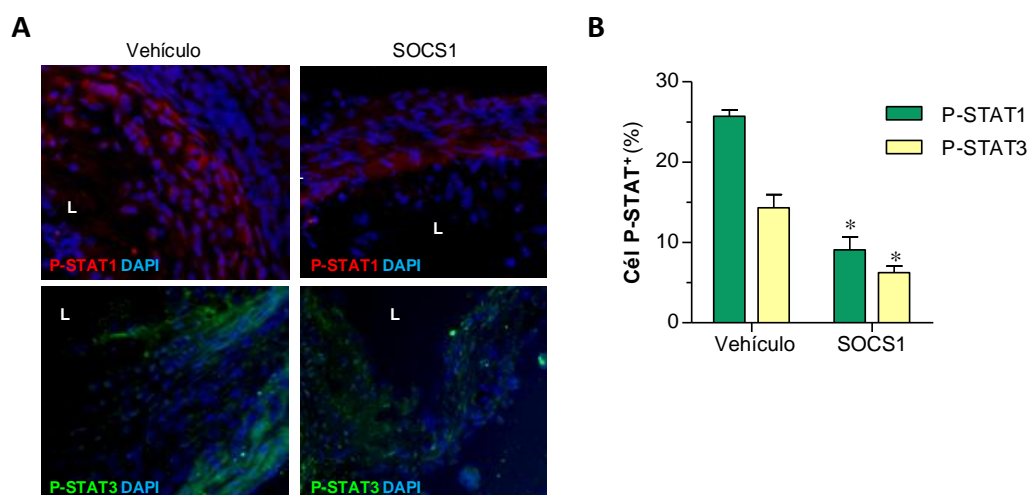


Figura 46. El péptido SOCS1 inhibe la activación de STAT en las placas de ateroma de ratones diabéticos. (A) Imágenes representativas (aumento x200; L, lumen) de la inmunofluorescencia de P-STAT1 (rojo) y P-STAT3 (verde) en secciones aórticas de ratones apoE^{-/-} diabéticos tratados con vehículo y péptido SOCS1 durante 10 semanas. (B) Cuantificación del número de núcleos positivos por área de lesión, expresado en porcentaje respecto al número de núcleos (DAPI). Media±EEM del total de animales por grupo. *P<0.05 vs vehículo.

2.3.4. El péptido SOCS1 limita el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis en los ratones diabéticos

La cuantificación del área y el contenido lipídico de las lesiones ateroscleróticas de ratones apoE^{-/-} diabéticos se realizó en cortes transversales seriados del arco aórtico teñidos con Oil-red-O/hematoxilina (**Figura 47A**). En el modelo de lesiones iniciales a las 6 y 10 semanas de estudio, se observó un aumento progresivo del tamaño de las placas ateroscleróticas en comparación con las lesiones del grupo de referencia (2 semanas de diabetes; **Figura 47B**). Por el contrario, los animales tratados con péptido SOCS1 mostraron una reducción de 35-40% (P<0.03) del área de la lesión en comparación con sus respectivos controles tratados

con vehículo (**Figura 47B**). Además del tamaño, el tratamiento con el péptido SOCS1 disminuyó significativamente la extensión a lo largo de la aorta (**figura 47C**) y el contenido lipídico de las placas (**Figura 47D**).

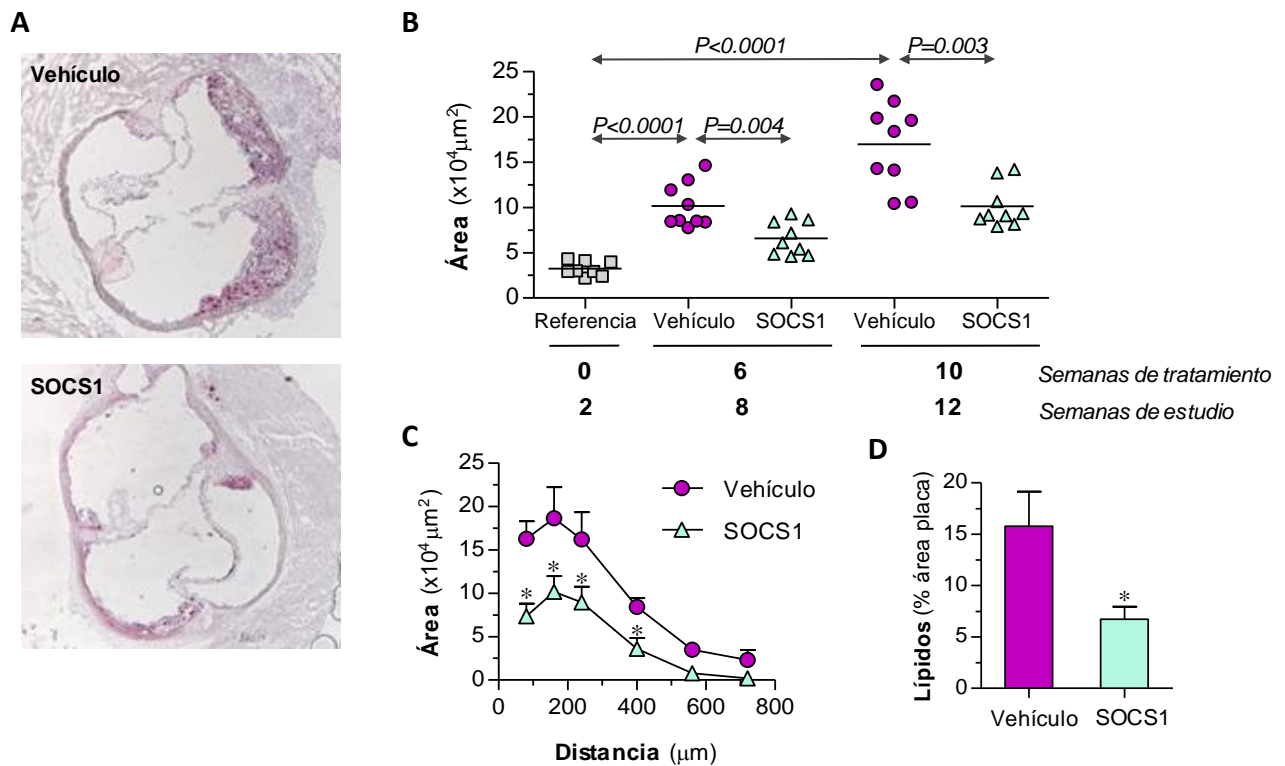


Figura 47. El péptido SOCS1 inhibe el desarrollo de la aterosclerosis en ratones diabéticos. (A) Fotomicrografías representativas (aumento $\times 40$) de la tinción Oil-red-O/hematoxilina en secciones del arco aórtico de ratones $\text{apoE}^{-/-}$ diabéticos después de 10 semanas de tratamiento. **(B)** Cuantificación del área de lesión individual en los grupos referencia, vehículo y SOCS1 en las distintas etapas del modelo. Valores de P indicados. **(C)** Valores medios del área de lesión a lo largo de la aorta después de 10 semanas de tratamiento. **(D)** Cuantificación del contenido lipídico en estas lesiones (área con Oil-red-O por área de lesión). Media \pm EEM del número total de animales por grupo. * $P < 0.05$ vs vehículo.

En estas muestras, el análisis de regresión lineal reveló una correlación positiva entre el área de lesión y las tinciones de P-STAT1 y P-STAT3 (Valores r de Pearson: 0.72 y 0.63, respectivamente; $P < 0.02$; **Figura 48**).

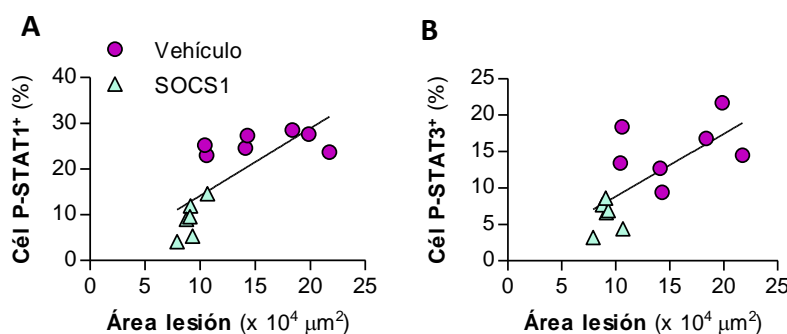


Figura 48. Correlación de la activación de STAT1 con el área de lesión de los ratones diabéticos. Análisis de regresión para P-STAT1 **(A)** y P-STAT3 **(B)** a las 10 semanas de tratamiento.

Para investigar si el péptido SOCS1 era capaz de frenar, no solo el desarrollo de lesiones tempranas, sino la progresión de la aterosclerosis ya establecida, se utilizó el modelo de lesiones avanzadas tras inducción de diabetes en ratones apoE^{-/-} de mayor edad (22 semanas). Comparativamente, las lesiones ateroscleróticas del modelo avanzado (**Figura 49**) fueron mayores que las del modelo inicial (**Figura 47**), en términos de área de la lesión (incremento del 75%) y extensión a lo largo de la aorta, aunque el contenido lipídico de ambas lesiones fue similar. Al igual que en el modelo de lesiones iniciales, el tratamiento con el péptido SOCS1 redujo el tamaño y la extensión de las lesiones aórticas (**Figura 49B y C**) así como su contenido lipídico (**Figura 49D**). Por el contrario, el péptido mutante no produjo ningún efecto inhibitor.

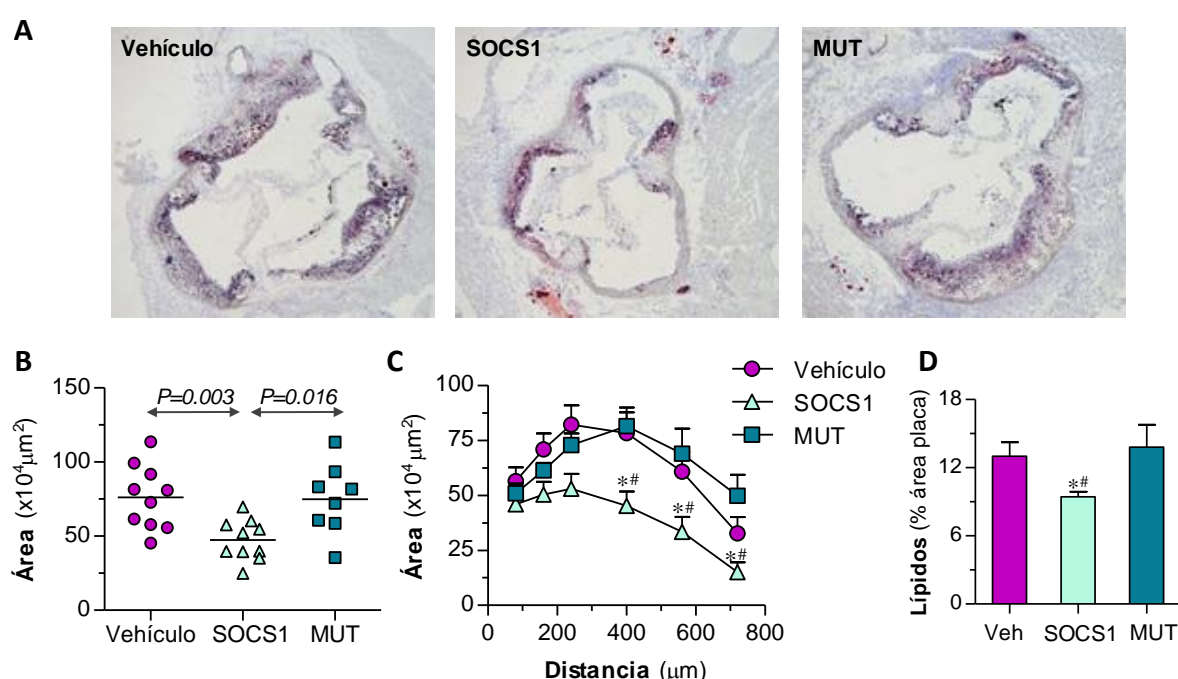


Figura 49. El péptido SOCS1 frena la progresión de la aterosclerosis en ratones diabéticos. (A) Tinciones Oil-red-O/hematoxilina representativas (aumento x40) en secciones del arco aórtico de ratones diabéticos (edad 22 semanas) a las 10 semanas de tratamiento. **(B)** Cuantificación del área de lesión individual en los grupos vehículo, SOCS1 y MUT. Valores de P indicados. **(C)** Medida del área de lesión a lo largo de la aorta. **(D)** Contenido lipídico (área Oil-red-O) en las lesiones. Media \pm EEM del número total de animales por grupo. * $P<0.05$ vs vehículo; # $P<0.05$ vs mutante.

2.3.5. El tratamiento con el péptido SOCS1 altera la composición de las placas de ateroma

Por su importancia en la patogenia de la aterosclerosis, se analizó mediante inmunohistoquímica el contenido de monocitos/macrófagos (MOMA-2) y linfocitos T (CD3) en las placas de ateroma de los ratones diabéticos (**Figura 50A**). La cuantificación de la tinción positiva mostró un menor número de células infiltrantes en las lesiones de los

ratones tratados con el péptido SOCS1 en comparación con los que recibieron vehículo (Figura 50B y C).

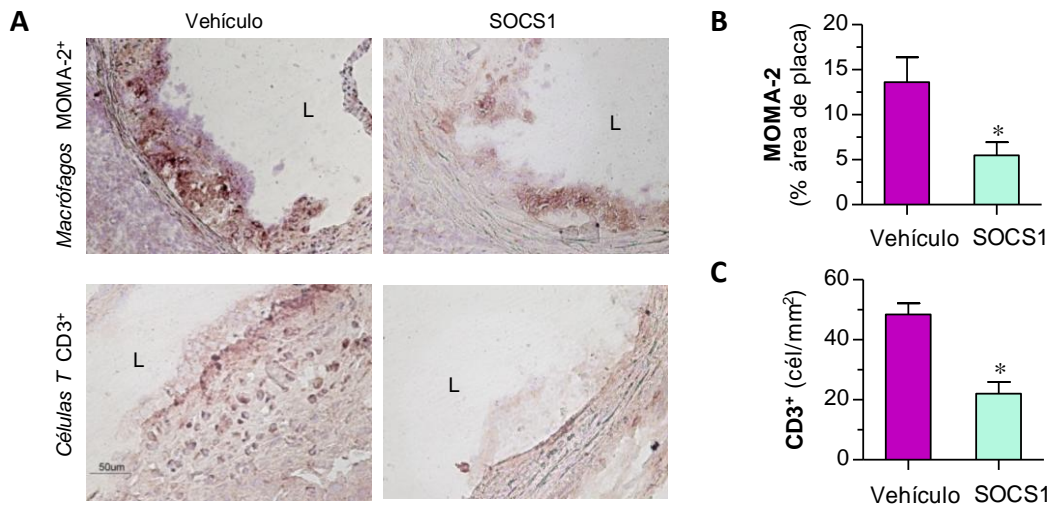


Figura 50. El tratamiento con el péptido mimético SOCS1 reduce el contenido de leucocitos en las placas ateroscleróticas de ratones diabéticos. (A) Imágenes representativas de la tinción de macrófagos (ampliación x200) y células T (ampliación x400) en secciones del arco aórtico de ratones apoE^{-/-} diabéticos. Se indica el lumen (L). Cuantificación de la tinción positiva para MOMA-2 **(B)** y CD3 **(C)**. Media±EEM del total de animales por grupo. *P<0.05 vs vehículo.

Para evaluar el grado de inestabilidad de las placas ateroscleróticas de los ratones diabéticos, se cuantificó el contenido de colágeno (tinción con rojo picrosirio) y de CMLV (inmunofluorescencia de α -actina). En comparación con el grupo vehículo, las lesiones de los ratones tratados con el péptido SOCS1 mostraron mayor contenido de colágeno y α -actina, indicando por tanto un fenotipo de placa más estable (Figura 51).

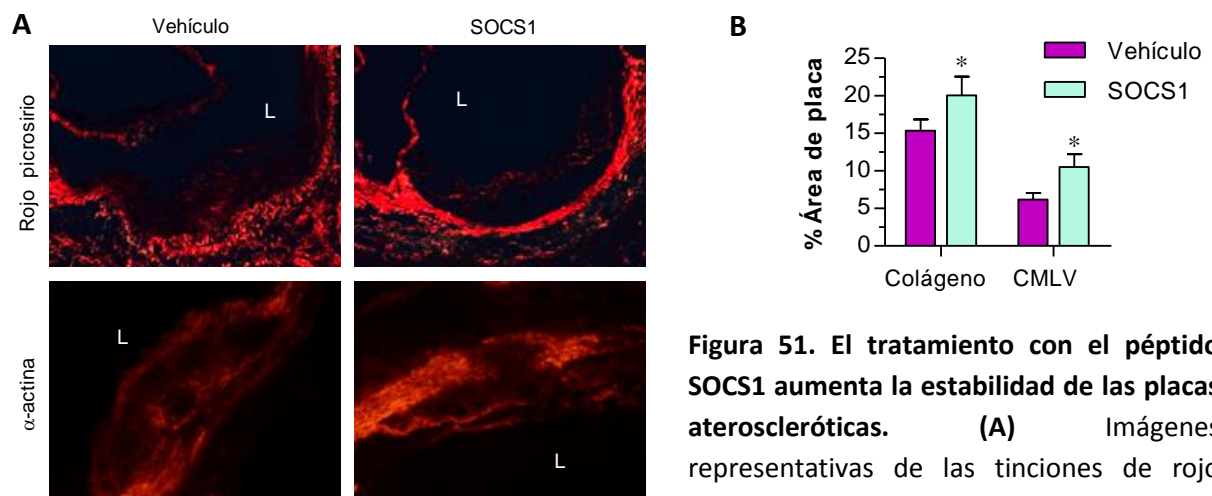


Figura 51. El tratamiento con el péptido SOCS1 aumenta la estabilidad de las placas ateroscleróticas. (A) Imágenes representativas de las tinciones de rojo picrosirio y α -actina (ampliación x100 y x200; L, lumen). **(B)** Cuantificación del contenido de colágeno (área rojo picrosirio) y CMLV (área α -actina) en las lesiones de los grupos de estudio. Media±EEM del total de animales por grupo. *P<0.05 vs vehículo.

Dado el papel clave de la inflamación durante todas las etapas de la aterosclerosis, se analizó la expresión de mediadores inflamatorios implicados en la aterogénesis, entre ellos las quimioquinas CCL2 y CCL5 y la citoquina proinflamatoria TNF α . Mediante inmunohistoquímica (**Figura 52A y B**) y PCR a tiempo real (**Figura 52C**) se comprobó que el tratamiento de los ratones diabéticos con el péptido SOCS1 redujo de forma significativa la expresión proteica y génica de estas tres moléculas inflamatorias en las lesiones ateroscleróticas.

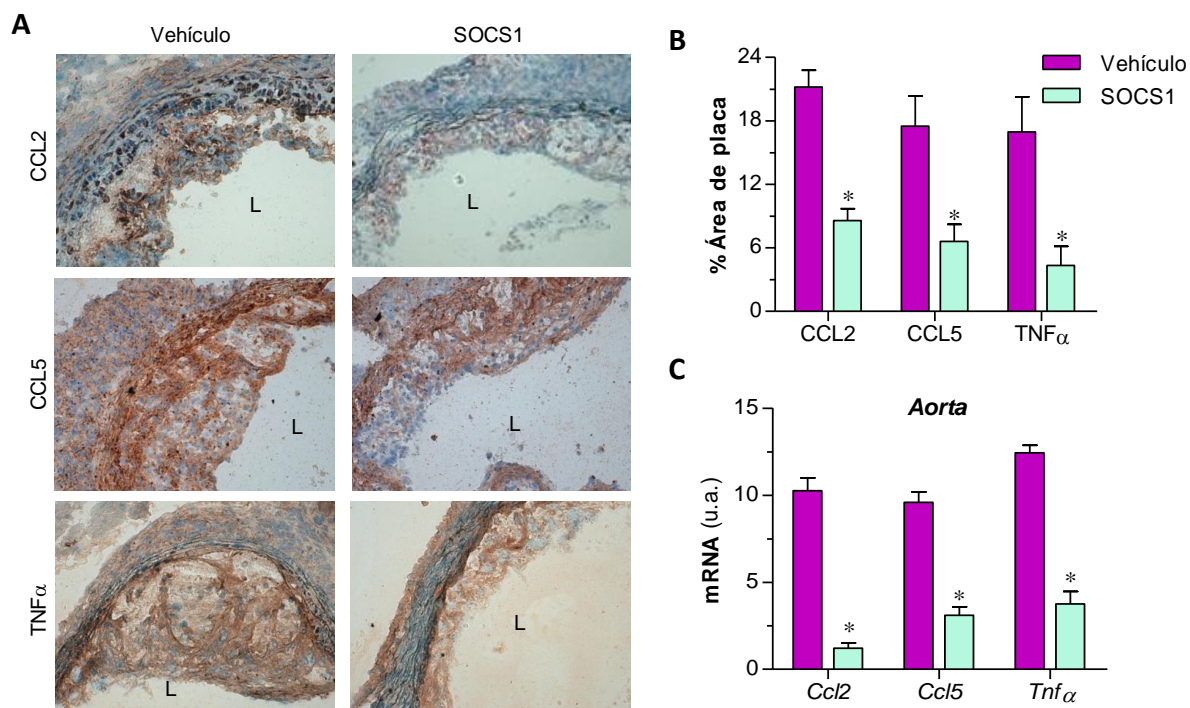
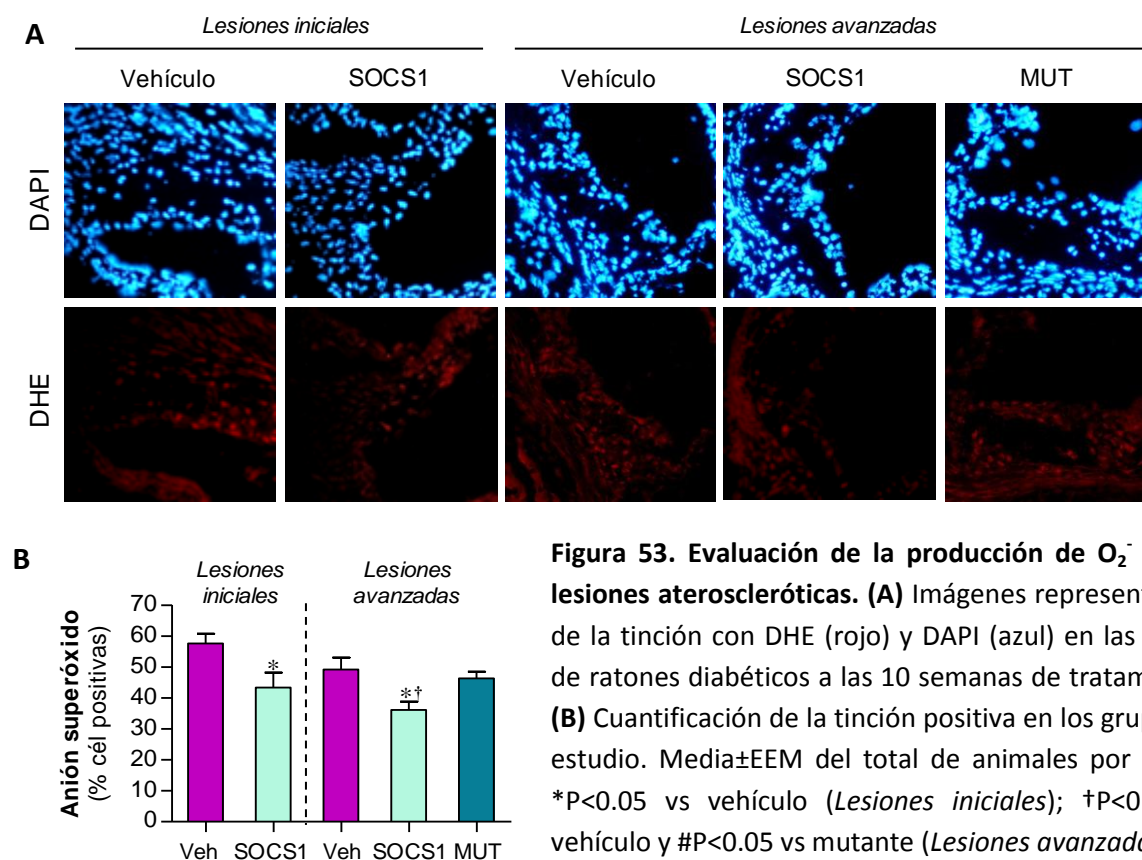


Figura 52. El péptido SOCS1 reduce la inflamación vascular en los ratones diabéticos. (A) Micrografías representativas (aumento x200; L, lumen) de la inmunodetección de CCL2, CCL5 y TNF α en secciones aorticas de ratones apoE^{-/-} diabéticos a las 10 semanas de tratamiento. **(B)** Cuantificación de la tinción positiva en los grupos de estudio. **(C)** Análisis mediante PCR a tiempo real de la expresión génica en aorta. Los valores normalizados por 18S se expresan en unidades arbitrarias (u.a.). Media \pm EEM del número total de animales por grupo. *P<0.05 vs vehículo.

2.3.6. El péptido SOCS1 reduce el estrés oxidativo intravascular en la diabetes

El estrés oxidativo, a través de la excesiva producción de ROS, juega un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis, ya que induce vasoconstricción, disfunción endotelial, migración y crecimiento celular y modificación de proteínas de matriz extracelular. Por ello, propusimos analizar el efecto del péptido SOCS1 sobre la producción de ROS en las aortas de los ratones diabéticos. En primer lugar, mediante tinción con DHE, se examinó la producción de anión superóxido en las lesiones ateroscleróticas de los modelos inicial y avanzado. En

ambos casos, el tratamiento con el péptido SOCS1 redujo significativamente el número de células con tinción positiva DHE en las lesiones aórticas (**Figura 53**). Por el contrario, el péptido mutante no tuvo ningún efecto antioxidante.



A continuación, evaluamos la expresión génica de las subunidades de la NADPH oxidasa, principal fuente de ROS en la vasculatura. El análisis por PCR cuantitativa a tiempo real demostró que el tratamiento con el péptido SOCS1 disminuía la expresión de las subunidades Nox1, NoxA1, NoxO1 y Nox4 en las aortas de los ratones diabéticos, en comparación con los que recibieron vehículo (**Figura 54**). La expresión constitutiva de p22phox no se vio alterada por la administración del péptido SOCS1.

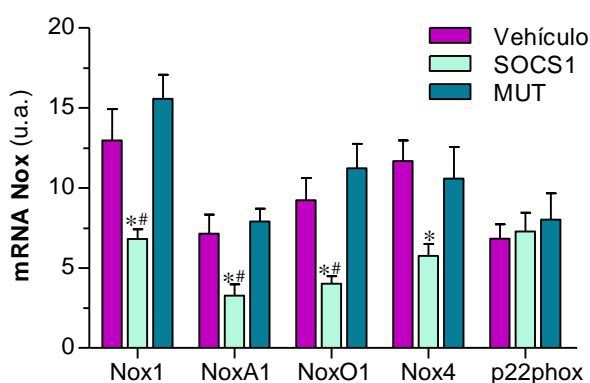


Figura 54. El péptido mimético de SOCS1 inhibe la expresión génica de las subunidades de la enzima NADPH oxidasa en las aortas de los ratones diabéticos. Análisis mediante PCR a tiempo real de las subunidades de NADPH oxidasa en aorta de ratones diabéticos. Los valores normalizados por 18S se expresan en unidades arbitrarias (u.a.). Media±EEM del total de animales por grupo. *P<0.05 vs vehículo; #P<0.05 vs mutante.

2.3.7. El tratamiento con el péptido SOCS1 bloquea la activación de la vía JAK/STAT en los riñones de ratones diabéticos

Tras conocer el beneficioso efecto del péptido SOCS1 en la aorta, procedimos a investigar la posible acción antiinflamatoria, antifibrótica y renoprotectora del péptido SOCS1 en el modelo experimental de diabetes tipo I inducida por STZ en ratones apoE^{-/-}.

Para comprobar si el péptido SOCS1 inhibía eficazmente la activación de JAK/STAT en el riñón de los ratones diabéticos, se analizó la fosforilación de las proteínas STAT1 y STAT3 mediante inmunohistoquímica en los cortes renales del modelo de lesiones iniciales (8 semanas de edad) a las 6 semanas de tratamiento. Observamos una intensa tinción nuclear en las células glomerulares y tubulointersticiales del grupo vehículo (**Figura 55A y B**). Además, la cuantificación de la tinción positiva en ambos compartimentos mostró una reducción significativa en el grupo SOCS1 (**Figura 55C y D**) y una correlación positiva entre la activación renal de STAT1 y STAT3 en los ratones del modelo experimental (**Figura 56**).

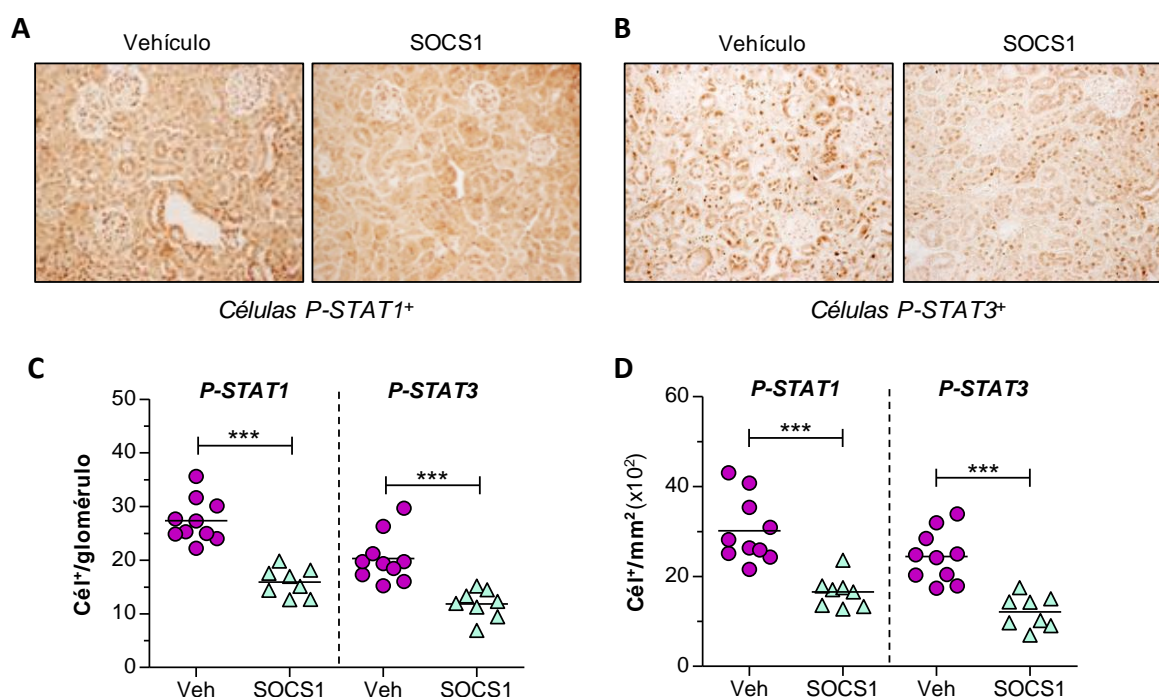


Figura 55. El tratamiento con el péptido SOCS1 inhibe la activación renal de STAT1 y STAT3 en los ratones diabéticos. Imágenes representativas (aumento x100) de la inmunohistoquímica de P-STAT1 (**A**) y P-STAT3 (**B**) en cortes renales de ratones diabéticos después de 6 semanas de tratamiento. Análisis cuantitativo del número de células positivas glomerulares (**C**) y tubulointersticiales (**D**) en cada animal. ***P<0.001 vs vehículo.

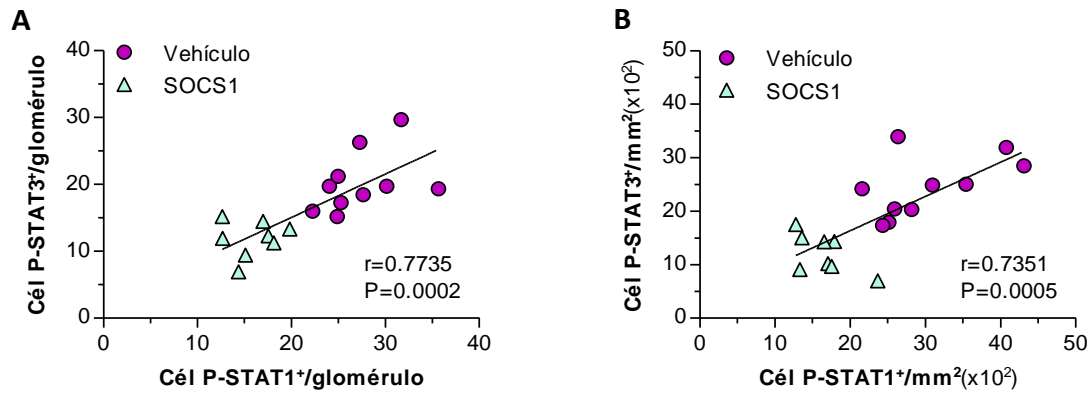


Figura 56. Correlación entre los niveles de activación renal de STAT1 y STAT3. Rectas de regresión en glomérulo (A) y tubulointersticio (B) de los ratones diabéticos del modelo de lesiones iniciales.

Los resultados de activación de STAT analizados por inmunohistoquímica se confirmaron mediante análisis Western blot en lisados de tejido renal. Se observó que en ambos estadios del daño renal por diabetes (lesiones iniciales y avanzadas), los ratones tratados con péptido SOCS1 mostraron una menor activación de STAT1 y STAT3 en comparación con los tratados con vehículo o con el control estructural mutante (Figura 57).

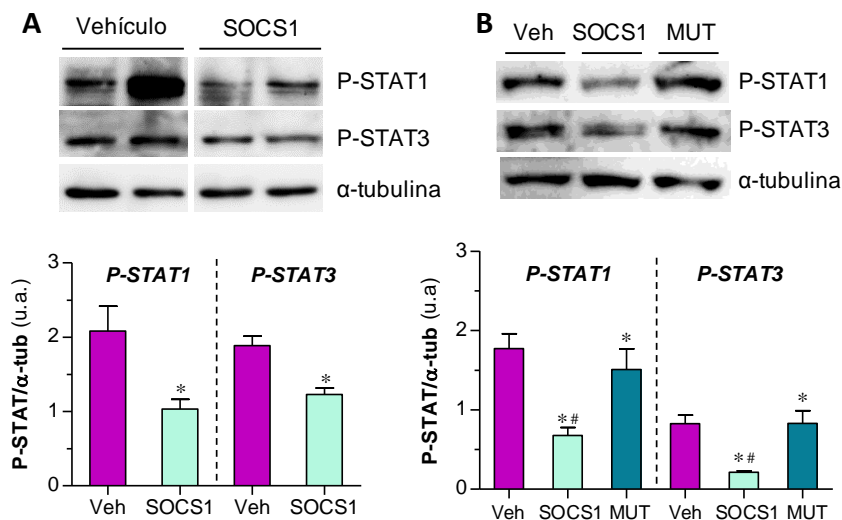


Figura 57. Activación de STAT en el riñón diabético. Western blot de P-STAT1 y P-STAT3 (α -tubulina, control de carga) en lisados renales del modelo de lesiones iniciales (A) y avanzadas (B). Geles representativos y análisis densitométrico normalizado. Media \pm EEM de $n=7-9$ animales por grupo. * $P<0.05$ vs vehículo; # $P<0.05$ vs mutante.

2.3.8. El péptido SOCS1 atenúa el daño renal inducido por diabetes

Como parámetros indicativos de disfunción renal se midieron los niveles de creatinina en suero, la relación albúmina/creatinina en orina y el peso renal relativo (peso renal/peso corporal), que se encontraron elevados en los ratones diabéticos en comparación con el grupo control de animales normoglucémicos. Además, el tratamiento con el péptido SOCS1 mejoró significativamente la función renal en los ratones diabéticos (Figura 58).

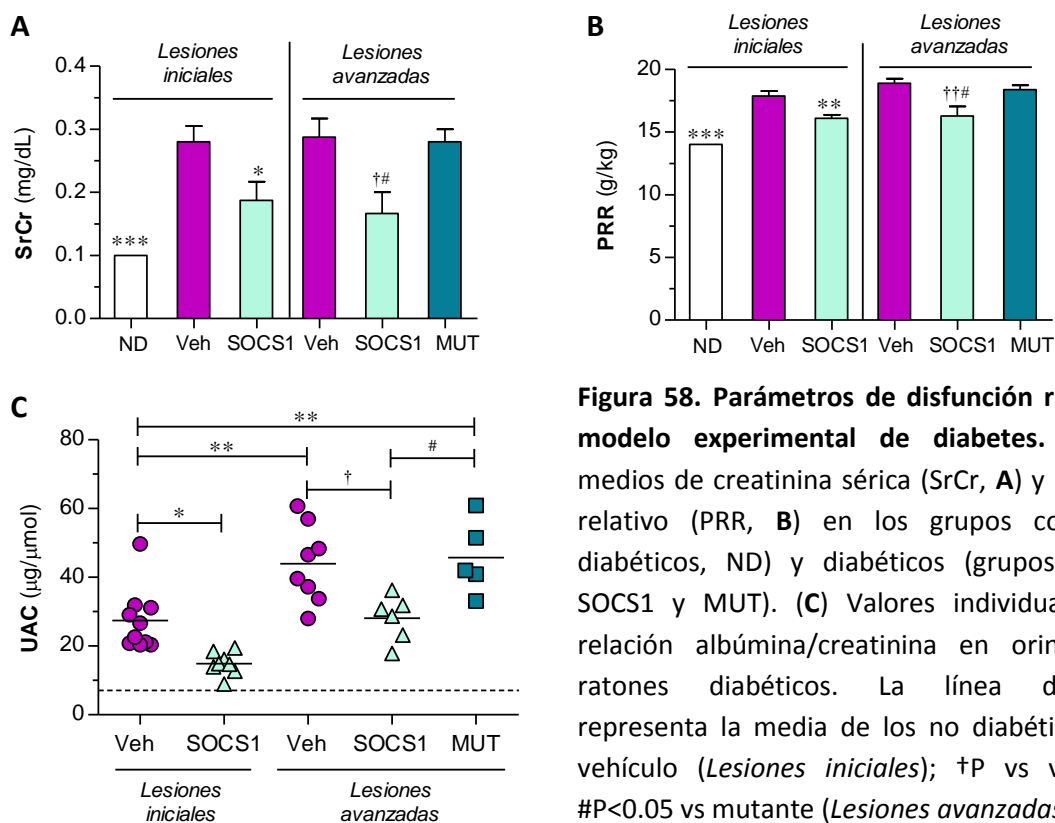


Figura 58. Parámetros de disfunción renal en el modelo experimental de diabetes. Valores medios de creatinina sérica (SrCr, **A**) y peso renal relativo (PRR, **B**) en los grupos control (no diabéticos, ND) y diabéticos (grupos vehículo, SOCS1 y MUT). (**C**) Valores individuales de la relación albúmina/creatinina en orina en los ratones diabéticos. La línea discontinua representa la media de los no diabéticos. *P vs vehículo (*Lesiones iniciales*); †P vs vehículo y #P<0.05 vs mutante (*Lesiones avanzadas*).

Los cambios en la morfología renal se evaluaron mediante tinción PAS en los cortes renales de los diferentes grupos (**Figura 59A**). En el modelo de lesiones iniciales, la valoración semicuantitativa del daño renal demostró que el tratamiento con péptido SOCS1 mejoraba los cambios patológicos tempranos asociados con la diabetes, reduciendo significativamente la hiper celularidad, expansión mesangial y dilatación capilar en el glomérulo, así como la atrofia y dilatación tubular, la fibrosis y el infiltrado intersticial (**Tabla 11**).

	Diabéticos		
	No diabético (n=5)	Vehículo (n=10)	SOCS1 (n=8)
Lesiones glomerulares:			
Hiper celularidad	0.20±0.19***	2.00±0.23	0.21±0.15***
Expansión de matriz mesangial	0.20±0.20***	2.30±0.21	0.38±0.18***
Dilatación capilar	0.00±0.00***	1.70±0.30	0.63±0.18*
Lesiones tubulares:			
Degeneración	0.40±0.24***	2.00±0.26	0.50±0.19***
Atrofia	0.20±0.20***	1.90±0.28	0.63±0.26**
Lesiones intersticiales:			
Fibrosis	0.00±0.00**	1.20±0.33	0.25±0.16*
Inflamación	0.10±0.14***	1.80±0.23	0.38±0.20***

Tabla 11. Valoración semicuantitativa (escala 0-3) del daño renal en el modelo de lesiones iniciales. Media±EEM del total de animales por grupo. *P<0.05 **P<0.01 ***P<0.001 vs diabéticos + vehículo.

Esta mejora en los cambios estructurales se confirmó mediante cuantificación del tamaño glomerular y del área mesangial PAS⁺ (**Figura 59B y C**) y análisis de la expresión del marcador de daño tubular KIM-1 (molécula de daño renal-1; **Figura 60**). Como se observa en ambas figuras, la diabetes indujo un incremento progresivo de estos tres parámetros y el tratamiento con el péptido SOCS1 los redujo significativamente, aunque no llegó a normalizarlos.

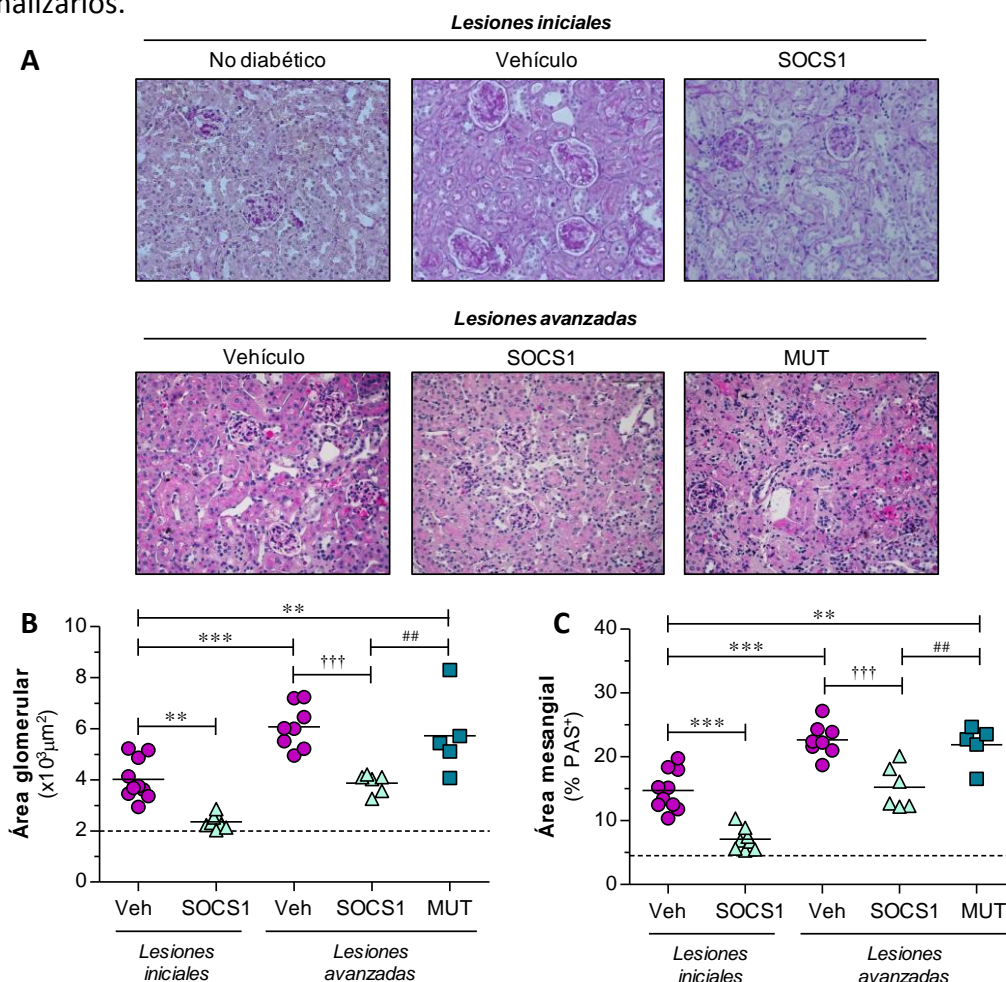


Figura 59. El péptido SOCS1 reduce el daño renal inducido por la diabetes. (A) Histopatología renal (tinción PAS; ampliación x100) de ratones apoE^{-/-} no diabéticos y diabéticos en los modelos de lesiones iniciales y avanzadas. Cuantificación del área glomerular (B) y del área mesangial PAS⁺ (C) en ambos modelos. La línea discontinua representa el valor medio de los ratones normoglucémicos. *P vs vehículo (*Lesiones iniciales*); †P vs vehículo y #P vs mutante (*Lesiones avanzadas*).

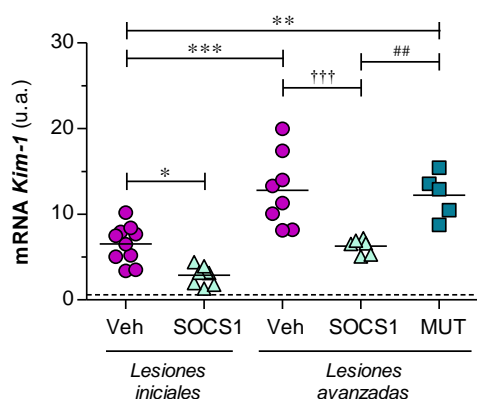


Figura 60. El péptido SOCS1 reduce el daño tubular. PCR cuantitativa de la expresión de *Kim-1* en riñones de ratones diabéticos (puntos) y normoglucémicos (línea). Datos normalizados con 18S y expresados en unidades arbitrarias (u.a.). *P vs vehículo (*Lesiones iniciales*); †P vs vehículo y #P vs mutante (*Lesiones avanzadas*).

2.3.9. El péptido SOCS1 frena la fibrosis renal en los ratones diabéticos

La aparición de fibrosis renal como consecuencia de la diabetes va ligada al acúmulo de proteínas de matriz extracelular tanto en glomérulos como en el tubulointersticio y es un proceso clave en la progresión del daño durante la nefropatía diabética. La fibrosis renal en los ratones diabéticos de los modelos de lesiones iniciales y avanzadas se analizó mediante tinción de fibras de colágeno con rojo picrosirio (**Figura 61**). La diabetes indujo un incremento progresivo de acumulación de colágeno glomerular y tubulointersticial, más atenuado en los ratones tratados con péptido SOCS1 en comparación con los grupos vehículo y mutante.

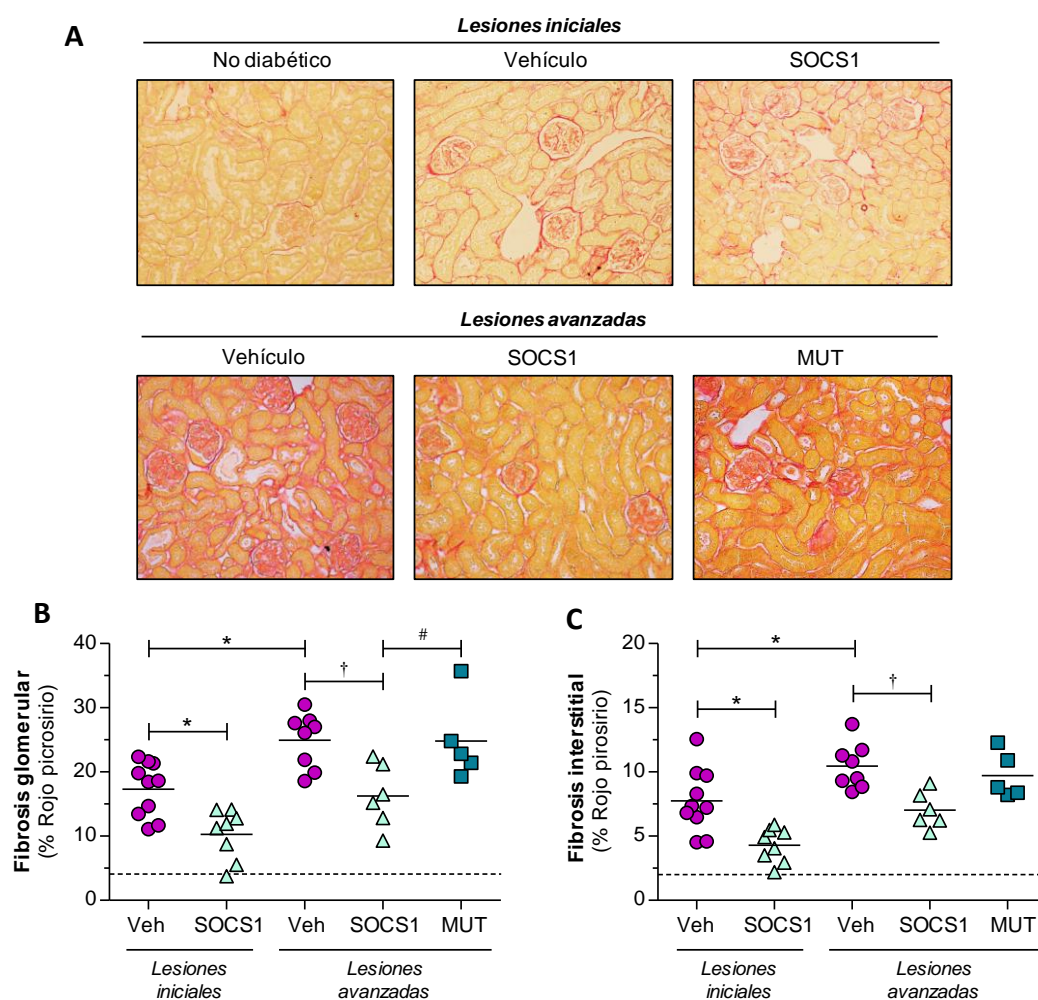


Figura 61. Disminución de la fibrosis renal por administración del péptido SOCS1. (A) Imágenes representativas (ampliación x100) de la tinción de colágeno con rojo picrosirio en animales no diabéticos y diabéticos. Cuantificación del área positiva glomerular (B) y tubulointersticial (C) en todos los grupos de estudio. Media±EEM del total de animales por grupo. La línea discontinua representa el valor medio del grupo de ratones normoglucémicos. *P<0.05 vs vehículo (*Lesiones iniciales*); †P<0.05 vs vehículo y #P<0.05 vs mutante (*Lesiones avanzadas*).

Asimismo, mediante PCR y Western blot confirmamos que el tratamiento con el péptido mimético de SOCS1 redujo los niveles de expresión de las proteínas de matriz extracelular fibronectina y colágeno I y del factor profibrótico TGF β (**Figura 62**).

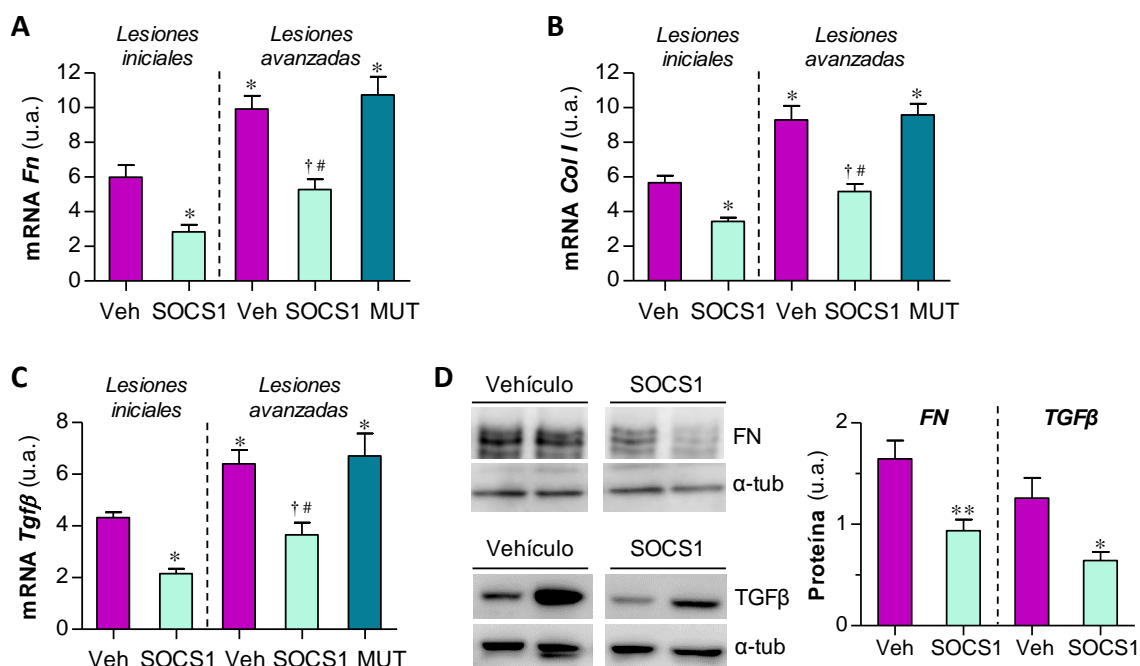


Figura 62. El péptido SOCS1 reduce la expresión de mediadores de fibrosis renal. PCR a tiempo real de la expresión de mRNA de fibronectina (*Fn*, **A**), colágeno 1 (*Col I*, **B**) y *Tgfβ* (**C**) en la corteza renal de ratones diabéticos. Los valores normalizados con 18S se expresan en unidades arbitrarias (u.a.). (**D**) Análisis Western blot de fibronectina (FN) y TGF β (α -tubulina, control de carga) en lisados totales de riñón. Se muestran geles representativos y el análisis densitométrico normalizado. Media \pm EEM del total de animales por grupo. * $P < 0.05$ vs vehículo (*Lesiones iniciales*); $^{\dagger}P < 0.05$ vs vehículo y $^{\#}P < 0.05$ vs mutante (*Lesiones avanzadas*).

2.3.10. Impacto del tratamiento con el péptido SOCS1 en la inflamación renal

Puesto que la inflamación también desempeña un papel determinante en el desarrollo de la nefropatía asociada a diabetes, se quiso evaluar el efecto del péptido SOCS1 en la respuesta inflamatoria del riñón diabético. Mediante tinción de inmunoperoxidasa se analizó el infiltrado renal de linfocitos T (CD3, **Figura 63A** y **C**) y de monocitos/macrófagos (F4/80, **Figura 63B** y **D**). En comparación con el grupo control (vehículo) los ratones diabéticos tratados con el péptido SOCS1 mostraron una reducción significativa del número de leucocitos infiltrados, tanto en el glomérulo como en el intersticio.

Por otro lado, el análisis de genes inflamatorios mediante PCR cuantitativa mostró una menor expresión renal de CCL2 (**Figura 63E**), CCL5 (**Figura 63F**) y TNF α (**Figura 63G**) en los

ratones diabéticos tratados con péptido SOCS1, tanto en el modelo de lesiones iniciales como en el de lesiones avanzadas. El péptido SOCS1 también previno la secreción proteica de las quimioquinas CCL2 y CCL5, medida por ELISA en los lisados de tejido renal (**Figura 63H**).

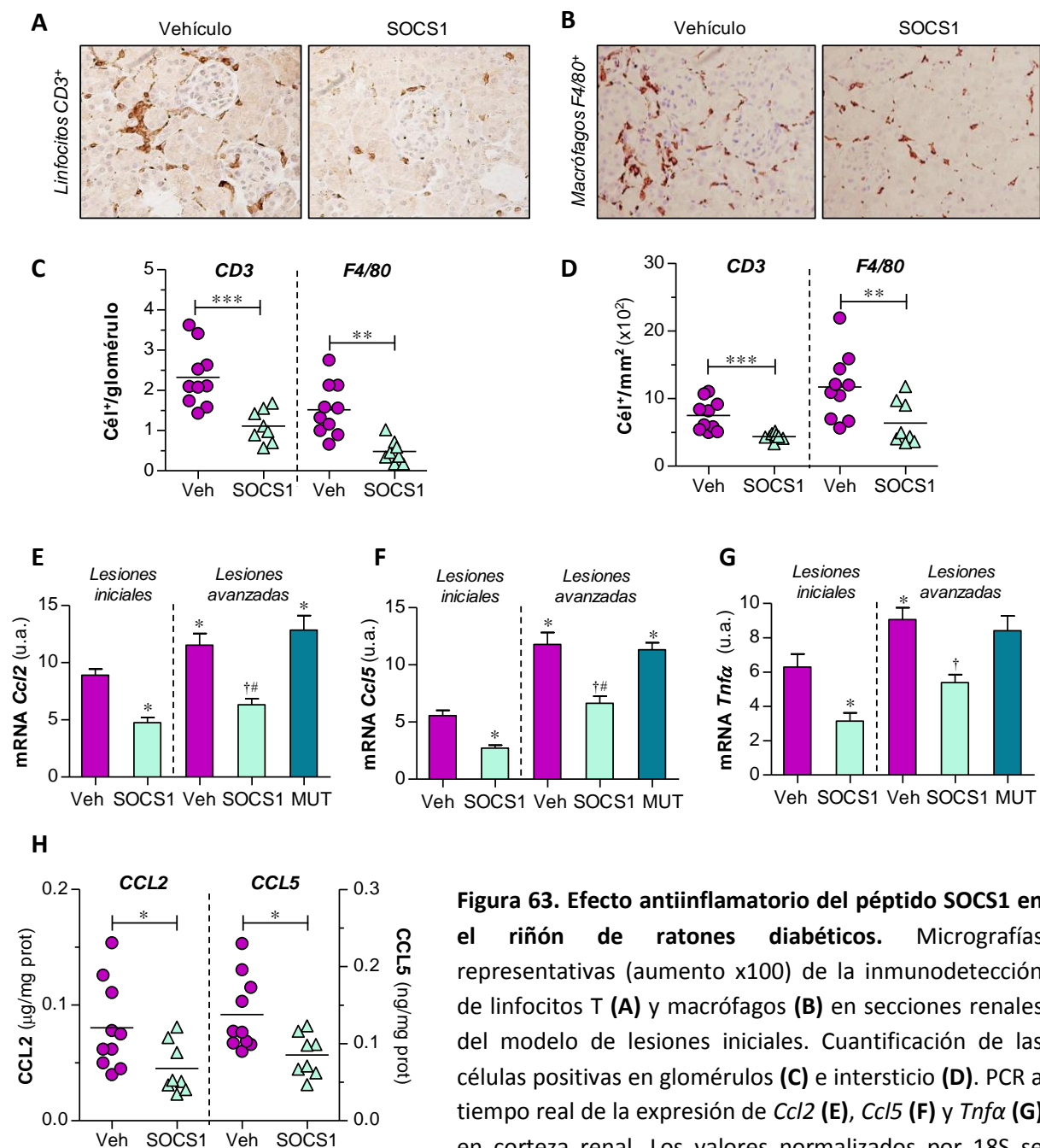


Figura 63. Efecto antiinflamatorio del péptido SOCS1 en el riñón de ratones diabéticos. Micrografías representativas (aumento x100) de la inmunodetección de linfocitos T (**A**) y macrófagos (**B**) en secciones renales del modelo de lesiones iniciales. Cuantificación de las células positivas en glomérulos (**C**) e intersticio (**D**). PCR a tiempo real de la expresión de *Ccl2* (**E**), *Ccl5* (**F**) y *Tnfa* (**G**) en corteza renal. Los valores normalizados por 18S se expresan en unidades arbitrarias (u.a.). (**H**) ELISA de CCL2 y CCL5 en los lisados tisulares de riñón. Valores individuales y media±EEM del total de animales por grupo. *P<0.05 vs vehículo (*Lesiones iniciales*); †P<0.05 vs vehículo y #P<0.05 vs mutante (*Lesiones avanzadas*).

Valores individuales y media±EEM del total de animales por grupo. *P<0.05 vs vehículo (*Lesiones iniciales*); †P<0.05 vs vehículo y #P<0.05 vs mutante (*Lesiones avanzadas*).

Dada la reducción en el número de macrófagos y en la expresión de mediadores proinflamatorios observada en los riñones de ratones diabéticos tratados con péptido SOCS1, se propuso estudiar su influencia en la polarización de los macrófagos infiltrados. La cuantificación de los niveles de expresión génica (**Figura 64A**) y proteica (**Figura 64B**) de las isoformas de arginasa (ArgII y ArgI) en el tejido renal demostró que los ratones tratados con péptido SOCS1 mostraban un fenotipo predominante de macrófagos M2 antiinflamatorios, mientras que en los del grupo vehículo dominaban los macrófagos M1. Además, el cálculo de la proporción relativa M1/M2 mostró una reducción significativa en el grupo tratado con péptido SOCS1 (**Figura 64B**).

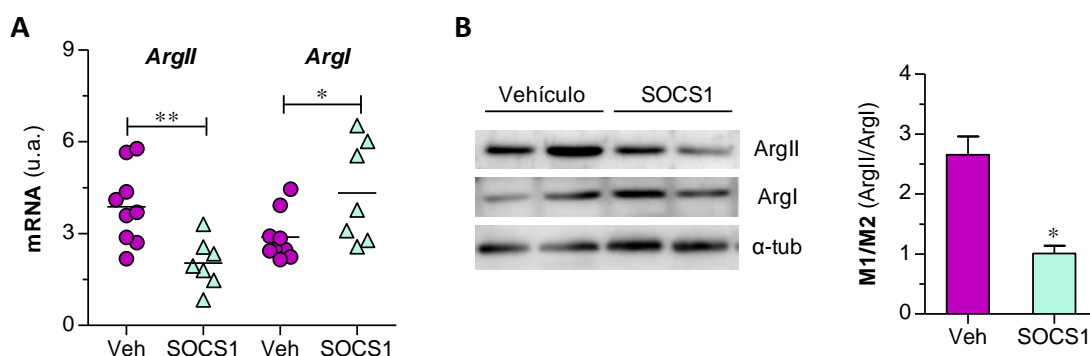


Figura 64. Efecto del tratamiento con SOCS1 en la polarización de macrófagos en el riñón diabético. **(A)** Análisis mediante PCR a tiempo real de la expresión de ArgII y ArgI en corteza renal de ratones diabéticos. Los valores normalizados con el control endógeno 18S se expresan como unidades arbitrarias (u.a.). **(B)** Análisis Western blot de las proteínas ArgII y ArgI (α -tubulina, control de carga). Geles representativos y resumen de los datos densitometrados expresados como relación M1/M2. Media \pm EEM del número total de animales por grupo. * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ vs Vehículo.

2.3.11. La activación de la vía JAK/STAT como marcador de daño renal en la nefropatía diabética

El cálculo del coeficiente de Pearson con los resultados obtenidos en el modelo experimental de nefropatía diabética mostró una correlación positiva y estadísticamente significativa entre la tinción nuclear de P-STAT1 en riñón y algunos parámetros indicativos de daño renal, como el área mesangial (PAS⁺; **Figura 65A**), el infiltrado leucocitario (**Figura 65B**) y la fibrosis (**Figura 65C**). Resultados similares se obtuvieron para la tinción de P-STAT3 (no mostrado). En la **Tabla 12** se resumen los resultados del análisis de regresión lineal de la activación de P-STAT1/P-STAT3 en los compartimentos glomerular y tubulointersticial con los diferentes parámetros de este estudio. A la vista de estos resultados, se podría concluir que la activación de la vía JAK/STAT es un buen marcador indicativo del daño, la inflamación y la fibrosis renal en los ratones diabéticos.

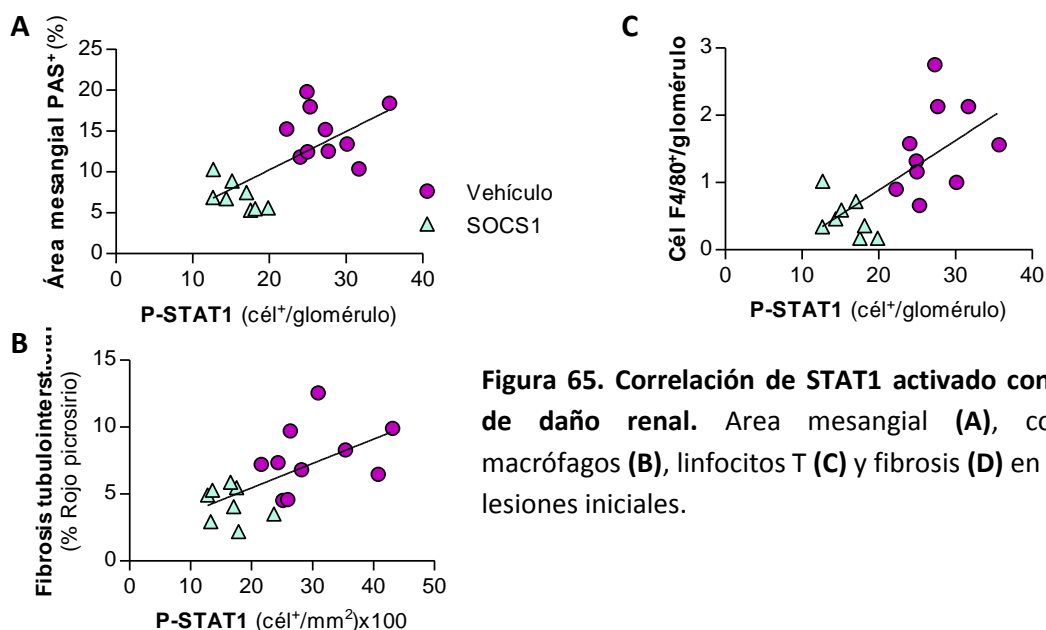


Figura 65. Correlación de STAT1 activado con parámetros de daño renal. Área mesangial (A), contenido de macrófagos (B), linfocitos T (C) y fibrosis (D) en el modelo de lesiones iniciales.

Variable	GLOMÉRULO				TÚBULO-INTERSTICIO			
	P-STAT1		P-STAT3		P-STAT1		P-STAT3	
	Pearson r	P valor	Pearson r	P valor	Pearson r	P valor	Pearson r	P valor
PRR (g/kg)	0.6055	0.0077	0.7109	0.0009	0.4717	0.0481	0.5995	0.0086
UAC (μg/μmol)	0.5991	0.0086	0.7149	0.0009	0.7423	0.0004	0.6723	0.0022
Área glomerular (μm ²)	0.9058	<0.0001	0.8097	<0.0001	ND	ND	ND	ND
Área mesangial (% PAS)	0.6822	0.0018	0.4587	ns	ND	ND	ND	ND
Fibrosis (%)	0.6608	0.0028	0.6963	0.0013	0.6185	0.0062	0.7312	0.0006
Cél CD3 ⁺	0.7011	0.0012	0.7621	0.0002	0.6417	0.0041	0.6082	0.0074
Cél F4/80 ⁺	0.6793	0.0019	0.7954	<0.0001	0.6847	0.0017	0.5603	0.0156
Kim-1 (u.a.)	0.6886	0.0016	0.4226	ns	0.5866	0.0105	0.5592	0.0158
Ccl2 (u.a.)	0.8077	<0.0001	0.7229	0.0007	0.7942	<0.0001	0.8257	<0.0001
Ccl5 (u.a.)	0.7662	0.0002	0.6541	0.0032	0.6608	0.0028	0.5621	0.0152
Tnfα (u.a.)	0.6726	0.0022	0.7607	0.0002	0.6502	0.0035	0.6262	0.0054
Fn (u.a.)	0.8198	<0.0001	0.7768	0.0001	0.8386	<0.0001	0.7230	0.0007
Col1 (u.a.)	0.7594	0.0003	0.6959	0.0013	0.7824	0.0001	0.8384	<0.0001
Tgfβ (u.a.)	0.7893	<0.0001	0.6412	0.0041	0.6869	0.0016	0.6777	0.0020

Tabla 12. Resumen de los valores de coeficiente de correlación de Pearson (r) y la significación (P) entre P-STAT1/P-STAT3 activado y variables de daño renal, inflamación y fibrosis en los compartimentos glomerular y tubulointersticial. ND: no determinado.

2.3.12. Efecto del tratamiento con el péptido mimético de SOCS1 en la inflamación sistémica

Puesto que el bazo es la mayor fuente de citoquinas involucradas en la inflamación sistémica, se analizó en este órgano la expresión de genes representativos de las respuestas linfocitarias Th. El tratamiento con péptido SOCS1 redujo la expresión génica de citoquinas proinflamatorias Th1 (IFN γ , IL-12 y TNF α), sin afectar los niveles de citoquinas antiinflamatorias Th2 (IL-4, IL-10) (**Figura 66**).

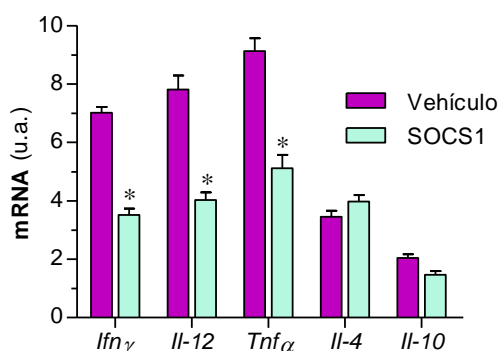


Figura 66. Efecto de SOCS1 en la inflamación sistémica. Análisis mediante PCR a tiempo real de genes de respuesta Th1 y Th2 en el bazo de ratones diabéticos. Media \pm EEM (n=8-9 ratones/grupo). *P<0.05 vs Vehículo.

Por último, el análisis de citometría de flujo en sangre periférica de los grupos vehículo y SOCS1 no mostró diferencias significativas en el número de linfocitos B, linfocitos T o monocitos, pero si en las subpoblaciones de monocitos circulantes. De esta forma, los ratones tratados con el péptido SOCS1 tenían una menor frecuencia de monocitos CD115⁺Ly6C^{alto} (más activados, proinflamatorios) y un aumento del tipo CD115⁺Ly6C^{bajo} (menos activados) en comparación con los controles (**Figura 67**). Estos resultados indican que el péptido mimético de SOCS1 no solo ejerce un importante papel protector en la inflamación local, sino que también actúa a nivel sistémico en los ratones diabéticos.

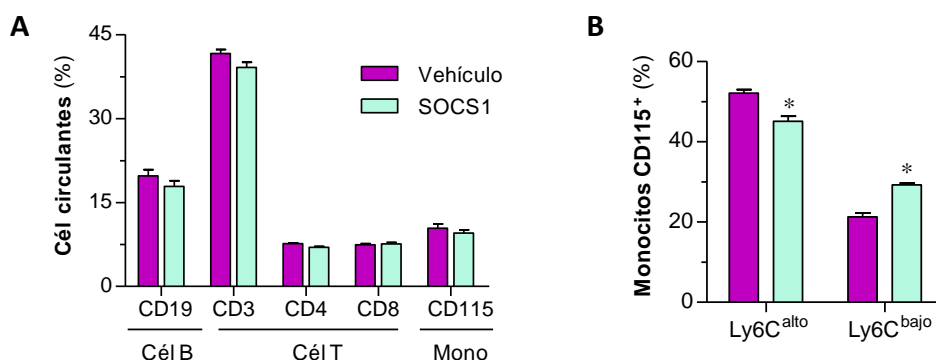


Figura 67. Estudio de las poblaciones leucocitarias en los ratones diabéticos. Resultados de la citometría de flujo en sangre periférica de los ratones apoE^{-/-} diabéticos en los que se muestra la proporción de leucocitos circulantes en los dos grupos de ratones (**A**) y la distribución de las poblaciones de monocitos CD115⁺ marcados con Ly6C (**B**). Los porcentajes de células positivas son media \pm EEM de n=8-9 ratones/grupo. *P<0.05 vs Vehículo.

V. *Discusión*

La diabetes mellitus es una enfermedad sistémica de elevado impacto socio-sanitario. Esto se debe principalmente a su creciente prevalencia en la población mundial y a las complicaciones crónicas que desencadena en los tejidos, que provocan un deterioro importante en la calidad de vida del paciente y son la principal causa de morbilidad y mortalidad de los enfermos diabéticos. Dado que los tratamientos convencionales para prevenir o frenar estas complicaciones de la diabetes son limitados y poco eficaces, numerosos estudios intentan identificar los mecanismos moleculares subyacentes al desarrollo y progresión de las complicaciones crónicas derivadas de la diabetes, así como analizar su potencial terapéutico.

En este sentido, el trabajo experimental aquí presentado contribuye a la identificación de nuevas dianas terapéuticas en la aterosclerosis y la nefropatía diabética basadas en la modulación de respuestas celulares y moléculas inflamatorias implicadas en ambos procesos patológicos. Concretamente, nuestros estudios se centran en las consecuencias de inhibir la activación crónica de la vía de señalización intracelular JAK/STAT mediante dos aproximaciones terapéuticas distintas basadas en la acción reguladora de la familia de proteínas SOCS. El primer abordaje preclínico consiste en la terapia génica con un adenovirus recombinante que codifica la proteína SOCS1 con el fin de modular la expresión de genes dependientes de JAK/STAT e implicados en el desarrollo de la placa de ateroma. A continuación, se planteó una segunda estrategia terapéutica basada en la funcionalidad de SOCS1, pero empleando otras moléculas más estables y eficientes, los péptidos miméticos, para su potencial uso terapéutico en dos de las principales complicaciones crónicas de la diabetes: la aterosclerosis y la nefropatía. A partir de la secuencia KIR de la proteína SOCS1 se diseñó un péptido sintético con permeabilidad celular y capaz de inhibir la activación de JAK/STAT y la expresión de sus genes diana, ejerciendo así un efecto antiaterosclerótico y renoprotector en los ratones diabéticos.

La vía de señalización intracelular JAK/STAT regula la expresión de una gran variedad de genes implicados en procesos de proliferación, diferenciación y migración celular, y su activación desempeña un papel clave en el desarrollo de la inflamación durante las complicaciones vasculares y renales de la diabetes. Diversos estudios han demostrado la activación de JAK/STAT en lesiones ateroscleróticas de pacientes, en biopsias renales y en modelos experimentales, así como en células vasculares y renales estimuladas con citoquinas, lípidos, glucosa y AngII^{97, 119, 127}, por lo que se ha propuesto esta vía intracelular como posible diana terapéutica en enfermedades cardiovasculares. Las proteínas SOCS

inducibles por JAK/STAT son capaces de bloquear la activación y/o fosforilación de JAK y STAT, constituyendo así un circuito de retroalimentación negativa. Alteraciones en este mecanismo regulador de la familia SOCS se han asociado con la patogenia de diversas enfermedades inmunes e inflamatorias^{100,104}, incluyendo las enfermedades cardiovasculares¹⁴⁵. Por ejemplo, la expresión local de las proteínas SOCS1 y SOCS3 aumenta en condiciones de inflamación crónica y aguda¹⁴⁶ y se ha propuesto que sus niveles en células mononucleares de sangre periférica podrían ser un buen marcador cardiovascular en pacientes con enfermedad renal crónica. En estos pacientes, los niveles de expresión de SOCS1 y SOCS3 se correlacionan con la pérdida progresiva de función renal y aumento de riesgo cardiovascular¹⁴⁷. Acorde con esto, trabajos previos de nuestro grupo describen la presencia de SOCS1 y SOCS3 en las placas ateroscleróticas humanas procedentes de endarterectomía carotídea (principalmente en las CMLV y los macrófagos de la zona inflamatoria)⁹⁷ y también en biopsias renales de pacientes diabéticos (localización glomerular y tubular)¹¹⁰. Varios estudios en ratones confirman también una expresión diferencial de proteínas SOCS en las lesiones ateroscleróticas en desarrollo^{97, 148, 149}. En modelos experimentales, la inducción de miembros de la familia SOCS o el uso de análogos proteicos son capaces de reducir la respuesta inmune innata¹⁵⁰ y de prevenir la aterosclerosis¹⁵¹, la miocarditis autoinmune¹⁵² y la progresión de las complicaciones de la diabetes¹¹⁰. En cuanto a los estudios específicos con la proteína SOCS1, se ha observado que su sobreexpresión previene el desarrollo de miocarditis autoinmune experimental y fallo cardíaco a través de la regulación de las respuestas de las células T autorreactivas¹⁵². Asimismo, en un modelo de uveítis inmunogénica, la administración de SOCS1 a través de una estructura peptídica confiere protección frente a la inflamación ocular mediante la inhibición de la respuesta Th17 y de la migración de células inflamatorias al interior de la retina¹⁵³. También se ha descrito la inducción de la proteína SOCS1 mediante el uso de microRNAs como posible abordaje terapéutico en cáncer de mieloma múltiple¹⁵⁴. En el contexto renal, la inducción de SOCS1 mediante plásmidos o adenovirus recombinantes disminuye la proteinuria, el daño renal, la inflamación y la acumulación intersticial de matriz extracelular en el tejido renal de animales diabéticos^{110, 136, 155}. Por el contrario, el silenciamiento de las proteínas SOCS provoca una activación continuada de STAT por las citoquinas, lo que exacerba la respuesta inmunoinflamatoria de los ratones ateroscleróticos e incrementa el tamaño de sus placas de ateroma^{97, 137}.

Además de las proteínas SOCS, diferentes inhibidores de la vía JAK/STAT han sido objeto de estudio para el abordaje de diversas patologías¹⁰². Entre ellos, productos naturales como la

curcumina (inhibidor de la expresión de STAT3) para el tratamiento de la psoriasis, o el resveratrol (inhibidor de la fosforilación de STAT3 por JAK1) utilizado en cáncer colorrectal, diabetes tipo 2 y enfermedades cardiovasculares. En fase de ensayo clínico se encuentran algunos inhibidores tirosina quinasa, como tofacitinib (inhibe la fosforilación de STAT vía JAK3) en artritis reumatoide y psoriasis, o sorafenib para tratar diversos tipos de cáncer. Pequeñas moléculas peptídicas como ISS-840 (bloquea la homodimerización de STAT1 y STAT3) presentan también potencial anticancerígeno.

Dada la importancia de la vía JAK/STAT/SOCS en la patología, el presente trabajo propone estudiar el efecto antiinflamatorio, antiaterosclerótico y renoprotector de la terapia génica o péptidica basada en SOCS1 como potencial estrategia en el contexto de la aterosclerosis y la nefropatía diabética.

1. LA TERAPIA GÉNICA CON LA PROTEÍNA REGULADORA SOCS1 COMO ALTERNATIVA TERAPÉUTICA EN LA ATEROSCLEROSIS

La terapia génica es una de las disciplinas biomédicas que ha permitido desarrollar técnicas y protocolos para tratar enfermedades cuyo origen radica en la alteración de la expresión génica o proteica. La terapia génica consiste en la introducción de ácidos nucleicos (DNA o RNA) en células, tejidos u órganos diana para aumentar o disminuir la expresión de una proteína con finalidad terapéutica, empleado diferentes vectores que permiten la expresión del gen de interés durante largos periodos de tiempo¹⁵⁶. Los vectores más característicos son los derivados de virus, preferentemente con genomas de DNA o con una fase de su ciclo vital como DNA de doble cadena¹⁵⁷. Además, es conveniente que tengan orígenes de replicación que multipliquen eficientemente sus genomas, para conseguir un elevado porcentaje del gen clonado. A esto se suma la importancia de intentar evitar una respuesta inmune del paciente, para que la terapia génica pueda utilizarse en protocolos *in vivo*. Entre los virus más utilizados como vectores eucarióticos están los retrovirus, los adenoasociados y los adenovirus¹⁵⁸.

En este trabajo se explora si la administración intravenosa de un vector adenoviral que codifica el gen SOCS1 es un método efectivo para determinar el papel modulador de las proteínas SOCS durante el proceso aterogénico. Como resultado de la inyección del adenovirus en el modelo experimental de aterosclerosis, se observa una elevada expresión local del transgen en la aorta de ratones apoE^{-/-}, sugiriendo una acción directa de SOCS1

sobre las células que constituyen la lesión aterosclerótica. Además, nuestro estudio demuestra que la administración del gen SOCS1 retrasa el desarrollo de aterosclerosis en los ratones y confirma que esta proteína es clave en el mantenimiento del equilibrio entre las respuestas proinflamatoria y antiinflamatoria. Entre los mecanismos implicados, demostramos que SOCS1 reprime la activación de los factores de transcripción STAT1 y STAT3 en las células de vaso y reduce la expresión de los genes dependientes de esta vía, como quimioquinas y sus receptores, moléculas de adhesión, citoquinas proinflamatorias y receptores *scavenger*. Como consecuencia, se impide el flujo de leucocitos a la zona de la lesión, se altera el balance fenotípico de monocitos/macrófagos y se reduce la activación de CMLV y el depósito de lípidos, favoreciendo así la estabilidad de la placa de ateroma.

En primer lugar, nuestros datos *in vitro* demuestran la función esencial de la proteína SOCS1 en la regulación de la activación proaterogénica excesiva de las CMLV y los macrófagos, dos importantes componentes celulares de la placa. En estas células, la sobreexpresión de SOCS1 previene la activación de STAT1, y en menor medida de STAT3, inducida por la estimulación con IFN γ e IL-6, dos citoquinas proaterogénicas implicadas en la formación y desestabilización de la placa¹⁵⁹. Asimismo, SOCS1 reduce la expresión de genes regulados por STAT, a la vez que aumenta los niveles de Arg1, el marcador de fenotipo M2 de macrófagos, alterando así en las células del vaso la capacidad proliferativa y migratoria, la liberación de mediadores y la formación de células espumosas, mecanismos subyacentes implicados en la aceleración de la aterosclerosis *in vivo*.

En el modelo experimental, nuestros resultados confirman que la administración del gen SOCS1 disminuye la activación de STAT1 y STAT3 en las lesiones ateroscleróticas de ratones apoE^{-/-} y, como consecuencia, limita la formación de las placas de ateroma. Los mecanismos subyacentes son independientes de cambios lipídicos, ya que no se encontraron diferencias significativas en los niveles de colesterol (total, HDL y LDL) y triglicéridos. Sin embargo, la inducción de SOCS1 altera el tamaño y la composición de las lesiones ateroscleróticas e inhibe la inflamación en la placa, como se demuestra por una menor expresión de genes inflamatorios involucrados en el reclutamiento, migración y activación de los monocitos y linfocitos circulantes y de las CMLV de la pared vascular. Es importante mencionar que la administración *in vivo* del gen SOCS1, no solo inhibe de forma efectiva el desarrollo de aterosclerosis en las fases tempranas de la enfermedad, sino que también frena significativamente su progresión en etapas más avanzadas. Esto sugiere un potencial papel

de SOCS1, no sólo en la prevención, sino en la regresión de las lesiones ya formadas, lo que le confiere mayor importancia como posible agente terapéutico en la aterosclerosis.

El análisis histológico de las lesiones ateroscleróticas iniciales del modelo experimental revela que la sobreexpresión de SOCS1 con adenovirus es capaz de reducir la acumulación de leucocitos (células T y macrófagos) en las placas, además de afectar al estado inflamatorio de los macrófagos infiltrados. Está descrito que SOCS1 regula la activación de macrófagos M1 del tipo inflamatorio, mediante la inhibición de la vía IFN γ /JAK2/STAT1, y favorece a su vez la polarización de los macrófagos a M2, el fenotipo implicado en procesos de resolución de la inflamación y de reparación tisular⁹⁴. Estudios previos han establecido que los macrófagos M2 de las placas ateroscleróticas muestran menor capacidad para acumular lípidos y transformarse en células espumosas^{28, 31}, mientras que los macrófagos M1 acumulados en los vasos dañados son capaces de secretar numerosas citoquinas inflamatorias encargadas de amplificar la respuesta Th1, inducir la proliferación de CMLV y favorecer la oxidación de lipoproteínas por la producción de ROS^{160,161}. Nuestros resultados en las lesiones de ratones transfectados con el gen SOCS1 muestran, además del menor contenido de macrófagos, una predominancia del fenotipo antiinflamatorio M2, lo que podría estar relacionado con una menor vulnerabilidad de las placas. Este hecho refuerza el potencial papel beneficioso de SOCS1 en la resolución de la inflamación en las placas de ateroma, ya que favorece la evolución hacia un entorno antiinflamatorio reparador, capaz de limitar el proceso de inflamación vascular crónica.

De forma paralela, las lesiones ateroscleróticas de ratones tratados con adenovirus recombinante SOCS1 presentaron un menor contenido lipídico y mayor contenido de colágeno en comparación con las lesiones de los grupos control, confirmando así un fenotipo de placa menos inflamada y más estable. Al mismo tiempo, en el tejido aórtico de los ratones tratados se detectó una expresión reducida de CD204 y CD36, dos receptores *scavenger* involucrados en la internalización de LDL modificadas y en la formación de células espumosas^{162,31}. La expresión de CD204 y CD36 se ha visto aumentada en pacientes con síndrome coronario agudo y en modelos animales de aterosclerosis¹⁶³ y su inhibición reduce la formación de células espumosas y el tamaño y la complejidad de las lesiones, lo que promueve su estabilidad¹⁶⁴. Puesto que la ruptura de una placa inestable (rica en leucocitos y lípidos y pobre en colágeno) es la principal causa de las complicaciones más severas de la aterosclerosis, proponemos el potencial uso de estrategias basadas en la proteína SOCS1

para modular las respuestas dependientes de JAK/STAT y ralentizar así la progresión de las lesiones.

En conjunto, este estudio aporta la primera evidencia de que la sobreexpresión del gen SOCS1 disminuye la carga aterosclerótica y la inflamación vascular e incrementa la estabilidad de las placas de ateroma en dos etapas diferentes de desarrollo de la aterosclerosis en un modelo experimental (**Figura 68**). Proponemos, por tanto, que la modulación de la familia de proteínas SOCS podría ser una interesante aproximación terapéutica para prevenir la activación patológica de la vía JAK/STAT durante la aterosclerosis.

Sin embargo, la terapia génica con adenovirus de SOCS1, aunque es efectiva para frenar el desarrollo de la aterosclerosis experimental, presenta una serie de limitaciones desde el punto de vista experimental y clínico. En primer lugar, ya que el genoma del adenovirus no se integra en el genoma de la célula huésped, la duración de la expresión del gen de interés en células en división es limitada. Además, es necesario que el adenovirus llegue de forma muy dirigida y efectiva al tejido diana, por lo que en ocasiones requiere la administración local para lograr efectividad. Pero el principal inconveniente de este tipo de terapia reside en la toxicidad que produce a altas dosis, sumado a la fuerte respuesta inmune celular y humoral que sigue a su administración en dosis repetidas, con la consiguiente disminución de su eficacia terapéutica en los tratamientos de tipo crónico¹⁶⁵.

2. DESARROLLO DE UN PÉPTIDO MIMÉTICO DE LA PROTEÍNA SOCS1 PARA EL TRATAMIENTO DE LAS COMPLICACIONES CRÓNICAS DE LA DIABETES.

Basados en los resultados anteriores, el segundo objetivo de nuestro estudio se centró en inhibir la vía JAK/STAT y sus respuestas biológicas asociadas durante el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes (aterosclerosis y nefropatía), pero empleando unas moléculas más estables y eficientes, los péptido miméticos.

Dado que la hiperglicemia y la hiperlipidemia constituyen dos factores de riesgo clínicamente importantes para el desarrollo de las complicaciones crónicas de la diabetes¹⁶⁶, empleamos para nuestros estudios un modelo experimental de diabetes tipo I en ratones hipercolesterolémicos apoE^{-/-}. Estos ratones apoE^{-/-} presentan leve albuminuria y lesiones renales, pero desarrollan aterosclerosis y nefropatía aceleradas cuando se les induce diabetes mediante inyección de STZ^{76, 167}.

Nuestros resultados en el modelo experimental demuestran, en primer lugar, una correlación positiva y estadísticamente significativa entre el estado de activación de la vía JAK/STAT en aorta y riñón y la severidad de la aterosclerosis y la nefropatía, respectivamente, lo que confirma el papel clave de la vía inflamatoria JAK/STAT en la patogénesis de las complicaciones diabéticas. Por otra parte, proporcionamos evidencia experimental de que el péptido mimético de la proteína SOCS1 empleado, inhibe eficazmente la activación de JAK/STAT, pudiendo ser una potencial estrategia terapéutica para suprimir las respuestas inflamatorias y fibróticas inducidas por la diabetes.

El concepto de emplear péptidos como agentes terapéuticos ha sido históricamente ignorado por la industria farmacéutica debido a su susceptibilidad de ser degradados, su tamaño y las subsecuentes limitaciones en los métodos de liberación. Sin embargo, recientemente ha surgido un enorme interés en los péptidos y sus miméticos como potenciales antagonistas para intervención terapéutica. Esto se debe principalmente al aumento en la vida media de los péptidos, la disponibilidad oral que se ha conseguido de un gran número de sistemas peptídicos, la introducción y aceptación de métodos de liberación alternativos y la prevalencia de la proteómica para identificar incontables marcadores de interacción proteína-proteína. Por todo esto, la utilización de péptidos que mimeticen la función de proteínas implicadas en procesos patológicos de numerosas enfermedades ha tomado un enorme interés en los últimos años. Por ejemplo, estudios recientes de nuestro grupo han descrito varios péptidos permeables basados en la inhibición de la activación de la vía clásica de NF- κ B, capaces de reducir el tamaño de las placas de ateroma en ratones ateroscleróticos, así como las lesiones renales y vasculares en ratones diabéticos^{168, 144}. Otros estudios han descrito una serie de péptidos miméticos de la apolipoproteína A-I (apoA-I) en enfermedades cardiovasculares, capaces de aumentar la funcionalidad de las partículas HDL, induciendo una respuesta antiinflamatoria y protectora frente al desarrollo de la aterosclerosis o diabetes¹⁶⁹⁻¹⁷¹. Algunos de estos péptidos se encuentran actualmente en fases iniciales de ensayo clínico en pacientes^{172, 173}.

El péptido en el que se centran nuestros estudios fue diseñado a partir de la región KIR SOCS1. Varios dominios de la proteína SOCS1 completa participan en la interacción directa con JAK2. Por un lado, el dominio SH2 se considera el responsable de la unión al sitio de autofosforilación en los residuos de tirosina de JAK^{115, 174}, mientras que los dominios ESS y KIR parecen estar involucrados en el mecanismo de unión¹⁷⁵. La región KIR (residuos 56-67) localizada en el extremo N-terminal de SOCS1 contiene la secuencia FRTFRSHSDYRR esencial

para interaccionar con la región catalítica de JAK (residuos 1001-1013 en JAK2) e inhibir su actividad tirosina quinasa. El péptido SOCS1 sintetizado contiene esta misma secuencia de aminoácidos, lo que le permite unirse específicamente a JAK2 y bloquear su actividad catalítica, inhibiendo consecuentemente la activación de STAT1 asociada a receptores de citoquinas (p. ej. IFN γ) y otros estímulos. A diferencia de otros péptidos derivados de SOCS1 descritos, como Tkip (inhibidor selectivo JAK2), este péptido derivado de KIR-SOCS1 no inhibe la autofosforilación de JAK2¹⁷⁶. También se diferencia de la secuencia intacta completa de la proteína SOCS1, la cual contiene otros dominios como la caja SOCS, que le permiten, además de inhibir la actividad quinasa de JAK, activar procesos de degradación proteosomal¹⁷⁶. El modelo predictivo del complejo SOCS1/JAK sugiere que el dominio KIR inhibe la actividad tirosina quinasa de JAK2 obstruyendo el acceso tanto del ATP como del sustrato a sus respectivos de unión, actuando como un pseudosustrato de JAK2¹⁷⁷.

En lo que respecta a la estructura del péptido SOCS1 empleado en nuestros estudios, el análisis espectroscópico de dicroísmo circular mostró una clara tendencia del péptido a adoptar una conformación α -hélice, confirmando un papel importante de la estructura secundaria del péptido derivado de SOCS1. Esto se corresponde con la estructura descrita de la región KIR en la molécula SOCS1 completa: 2 α -hélices en R57–R69 y L74–A77 unidas por un pequeño segmento en espiral¹⁷⁷.

En los estudios experimentales usamos como control estructural un péptido mutante, cuya secuencia no incluye los dos residuos de fenilalanina (sustitución F \rightarrow A) fundamentales para inhibir JAK. Además, las dos secuencias peptídicas (SOCS1 y MUT) se sintetizaron unidas a un dominio de transducción proteica que les confiere permeabilidad celular. Las regiones de permeabilización celular son pequeñas secuencias de aminoácidos hidrofóbicos capaces de atravesar las membranas celulares y/o localizarse en compartimentos subcelulares. Existen varias secuencias, como la proteína Tat, la proteína Antennapedia de *Drosophila* o los péptidos sintéticos ricos en arginina, lisina u ornitina¹⁷⁸. En este trabajo hemos empleado una secuencia de palmitato-lisina unida a la región inhibidora SOCS1 a través de un espaciador. Estudios previos han demostrado que la N-palmitolación es suficiente para permitir que un péptido atraviese la membrana celular (pero no la nuclear) y además confiere protección frente a la degradación enzimática endosomal¹⁷⁹. De acuerdo con esto, nuestros resultados demostraron que, efectivamente, el péptido sintético derivado de SOCS1 era eficazmente internalizado por las células vasculares y renales *in vitro* e *in vivo* de forma tiempo-dependiente y además era capaz de inhibir la activación patológica de las

proteínas STAT1 y STAT3, mejorando la aterosclerosis y la disfunción renal en los ratones diabéticos.

En los últimos años, varios estudios experimentales han descrito el potencial terapéutico de distintos péptidos derivados de SOCS en diversas patologías. Johnson y colaboradores emplearon diferentes secuencias derivadas de SOCS1, entre ellos el péptido Tkip, para suprimir la señalización mediada por receptores de citoquinas mediante su unión al sitio de autofosforilación de JAK2, previniendo así la fosforilación de STAT1 y STAT3 y regulando las respuestas inflamatorias implicadas en enfermedades como la encefalomiелitis alérgica experimental¹⁸⁰. De forma similar, otros péptidos derivados de la secuencia inhibidora de SOCS1 bloquearon eficazmente la señalización de JAK2/STAT1 mediada por células T en leucocitos, esplenocitos y queratinocitos, sugiriendo un potencial terapéutico de estos péptidos en el tratamiento de enfermedades inflamatorias^{181, 182, 183}. Hasta el momento, los efectos *in vivo* de moléculas miméticas de SOCS1 se han estudiado en modelos murinos de esclerosis múltiple^{180, 182}, daño nervioso periférico¹⁸⁴ e infección viral¹⁸⁵, pero no en enfermedades cardiovasculares y metabólicas. Nuestros estudios aportan las primeras evidencias del efecto antiaterosclerótico y renoprotector de un pequeño péptido derivado de la región KIR de SOCS1 en la aterosclerosis y el daño renal asociados a diabetes.

Numerosos estudios han mostrado las interesantes propiedades de las proteínas SOCS relacionadas con la patogénesis de la diabetes^{104, 186, 187}. De hecho, se ha observado que ratones deficientes en SOCS1 mostraban bajos niveles de glucosa en sangre y una elevada señalización de insulina, sugiriendo un papel de SOCS como enlace entre niveles elevados de citoquinas y la resistencia a insulina^{188, 189}. Otros hallazgos proponen que la inducción de SOCS1 puede proteger a las células β pancreáticas, lo que puede limitar el desarrollo de diabetes tipo I mediada por células T CD8⁺ y prevenir el daño tisular inducido por la señalización por citoquinas en diversas enfermedades inflamatorias^{135, 190}. No obstante, nuestros estudios demuestran que el efecto beneficioso del péptido derivado de SOCS1 en el modelo experimental fue independiente de cualquier influencia apreciable sobre el metabolismo de la diabetes, ya que no se observaron cambios en la hiperglicemia, el perfil lipídico o el peso de los ratones diabéticos. Por este motivo, proponemos que el péptido derivado de SOCS1 puede ser una estrategia efectiva para frenar la progresión de las complicaciones diabéticas. Sin duda se requieren más estudios sobre la participación del eje JAK/STAT/SOCS en los procesos patológicos que desencadenan la diabetes mellitus, para

poder elucidar si la terapia basada en la funcionalidad de SOCS mejora el metabolismo de la glucosa en condiciones diabéticas y confiere protección frente al estrés metabólico.

En primer lugar, el presente trabajo caracterizó *in vitro* el efecto protector del péptido derivado de SOCS1 en células vasculares y renales, participantes celulares clave en los procesos patológicos durante el desarrollo de la placa de ateroma y del daño renal asociados a diabetes, respectivamente. También analizamos el impacto del péptido sobre los macrófagos, células que desempeñan un papel crucial en las respuestas inflamatorias que subyacen a la aterosclerosis y nefropatía¹⁹¹. Además de inhibir la fosforilación de STAT1 y STAT3 y su consiguiente translocación nuclear, el péptido SOCS1 previno las respuestas celulares inducidas por IFN γ e IL-6, dos citoquinas proinflamatorias típicas de la activación de JAK/STAT¹⁰⁰ e involucradas tanto en el desarrollo, progresión y desestabilización de la placa aterosclerótica, como en la evolución de las lesiones renales y la fibrosis^{44, 192}. En ratones y pacientes con diabetes se ha detectado una excesiva producción de estas citoquinas proinflamatorias que, en interacción con la hiperglicemia, participan activamente en el reclutamiento, infiltración y activación de leucocitos, así como en las interacciones entre células residentes y macrófagos y en procesos de proliferación y migración celular^{67, 77, 193-195}. En línea con esto, nuestros estudios en CMLV, células mesangiales, tubulares y macrófagos, mostraron que el péptido derivado de SOCS1 suprimía la expresión de mediadores inflamatorios dependientes de JAK/STAT, en particular de las quimioquinas reclutadoras de monocitos y linfocitos T (CCL2 y CCL5), la molécula de adhesión ICAM-1 y las citoquinas proinflamatorias TNF α y CXCL10, todos ellos involucrados activamente en la respuesta inflamatoria que tiene lugar en la aterosclerosis y la nefropatía^{77, 90, 91, 159}. Consecuentemente, los procesos de proliferación, migración y adhesión celular, fueron también frenados por acción del péptido SOCS1.

En paralelo a los estudios *in vitro*, observamos que el efecto del péptido SOCS1 en el modelo experimental iba acompañado de una importante reducción del tamaño de la placa de ateroma en diferentes estados de desarrollo de la aterosclerosis. Además, el tratamiento con el péptido mimético alteró la composición de las placas de ateroma, incrementando la proporción relativa colágeno/lípido y CMLV/macrófagos, parámetros indicativos de un fenotipo de placa menos inflamado y más estable. Puesto que las principales consecuencias clínicas de la aterosclerosis ocurren cuando una placa de carácter inestable se rompe y favorece a la formación de trombos que desencadenan eventos como infarto de miocardio o ictus cerebral¹⁴¹, sugerimos el potencial uso de la terapia con el péptido derivado de SOCS1

para frenar el desarrollo de la aterosclerosis inicial y además retardar la progresión de las lesiones ateroscleróticas ya establecidas, evitando su inestabilidad y ruptura.

La administración del péptido SOCS1 en el modelo experimental también ejerció un impacto beneficioso sobre los parámetros funcionales y las lesiones renales inducidas por la diabetes. El péptido provocó un descenso de la hiperfiltración glomerular asociada a estadios iniciales de la nefropatía, probablemente como resultado de una reducción de la hiperplasia y la hipertrofia mesangial, ambos procesos implicados en el incremento de volumen glomerular afectados por la hiperglicemia a través de JAK/STAT. Esto sugiere el potencial del péptido mimético de SOCS1 para frenar el daño renal asociado a diabetes.

El concepto de que los mecanismos inmunoinflamatorios desempeñan un papel fundamental en el desarrollo y progresión del daño vascular y renal asociado a diabetes, está completamente demostrado^{196, 197}. Los macrófagos y linfocitos T pueden interactuar con las células residentes (vasculares o renales) o pueden activar mediadores implicados en procesos de proliferación, migración, diferenciación celular y producción de matriz extracelular, entre otros^{195, 198, 199}. Dado que la vía JAK/STAT es un mecanismo estrechamente ligado a las acciones de citoquinas, se han probado numerosas estrategias basadas en abolir las señales inflamatorias inducidas por la activación de JAK/STAT en diversas enfermedades, como los inhibidores farmacológicos de JAK2 (baricitinib, filgotinib o AG490)²⁰⁰⁻²⁰², de STAT (fludarabine)²⁰³, oligonucleótidos antisentido de STAT¹¹⁰ o adenovirus de sobreexpresión de SOCS¹³⁶, entre otros. Nuestros estudios confirman la capacidad antiinflamatoria del péptido mimético de SOCS1, por un lado en las placas ateroscleróticas, y por otro lado en los riñones de los ratones apoE^{-/-} diabéticos, en asociación con una menor acumulación de macrófagos y linfocitos T en las lesiones, apoyando el papel clave de la vía JAK/STAT/SOCS en la regulación del infiltrado leucocitario en la aterosclerosis y la nefropatía diabética. Además de la reducción en el infiltrado de macrófagos, la administración del péptido SOCS1 tuvo consecuencias en el fenotipo de los mismos. Como se ha comentado anteriormente, la proteína SOCS1 limita la activación clásica de macrófagos proinflamatorios M1 y favorece la polarización de los macrófagos a un fenotipo reparador M2 antiinflamatorio⁹⁴. En el riñón, la acumulación de macrófagos está estrechamente asociada con el grado de daño estructural y la disfunción renal. Recientes estudios sugieren que la polarización de macrófagos juega un papel crucial en la progresión de diversas enfermedades renales como el daño por isquemia-reperfusión, la glomerulonefritis y la nefropatía diabética, entre otras²⁰⁴. De acuerdo con estos estudios, nuestros resultados

demuestran que el péptido mimético de SOCS1 favorece la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo reparador M2, disminuyendo la proporción relativa M1/M2, tanto en el tejido renal de los ratones diabéticos como en cultivos primarios de macrófagos derivados de médula ósea.

Numerosos estudios han puesto de manifiesto que tanto la esclerosis glomerular como la fibrosis intersticial son características patológicas significativas en la nefropatía diabética^{205, 206}. El depósito de proteínas de matriz extracelular debido a alteraciones en su síntesis y degradación constituye la base del proceso fibrótico en el riñón⁹². Por ello, para dilucidar si el tratamiento con el péptido SOCS1 era capaz de impedir la formación de fibrosis en los riñones diabéticos, se evaluó el depósito de colágeno renal mediante tinción con rojo picrosirio, así como la expresión de proteínas de matriz extracelular (fibronectina y colágeno I) y factores profibróticos (TGF β) tanto en el tejido renal como en células en cultivo. Los resultados pusieron de manifiesto el efecto antifibrótico y protector del péptido derivado de SOCS1.

El estrés oxidativo, entendido como un desequilibrio entre los sistemas oxidantes y antioxidantes en las células, desempeña un papel crucial en el desarrollo de las complicaciones diabéticas, tanto micro como macrovasculares²⁰⁷. Por ejemplo, la sobreexpresión de la enzima antioxidante superóxido dismutasa en un modelo de ratones diabéticos transgénicos previno el desarrollo de nefropatía, retinopatía y cardiomiopatía diabética²⁰⁷. Además, diferentes estudios *in vivo* demuestran el papel de la hiperglicemia en la generación de estrés oxidativo, causando disfunción endotelial en la vasculatura de los pacientes diabéticos²⁰⁸. Nuestros estudios en el tejido aórtico de los ratones apoE^{-/-} diabéticos, así como en células vasculares en cultivo, mostraron que la administración del péptido derivado de SOCS1 disminuía significativamente la generación intravascular de anión superóxido por el sistema enzimático de la NADPH oxidasa, así como la expresión de sus principales subunidades Nox1, NoxA1, NoxO1, Nox4, Nox2, p47phox y p67phox, sugiriendo la importancia del eje JAK/STAT/SOCS en la producción de ROS vascular durante la diabetes. Esto concuerda con lo observado por Manea y colaboradores, quienes emplearon el inhibidor de JAK AG490 para inhibir la producción de O₂⁻, la actividad NADPH oxidasa, la expresión de Nox1, Nox2 y Nox4 y, por consiguiente, limitar el desarrollo de aterosclerosis en ratones apoE^{-/-} alimentados con dieta hiperlipídica²⁰⁹.

Además del efecto antiinflamatorio local del péptido SOCS1 observado en el tejido aórtico y renal de los ratones diabéticos, también detectamos una acción indirecta del tratamiento sobre la inflamación sistémica. Se ha descrito que el desequilibrio entre las respuestas Th contribuye al desarrollo de aterosclerosis, de manera que el aumento de citoquinas Th1 (en particular IFN γ , TNF α e IL-12) y Th17 (IL-17) promueve la inflamación vascular, mientras que las respuestas Th2 y Treg (mediadas principalmente por IL-4 y Foxp3, respectivamente) reducen esta inflamación^{159, 210, 211}. La familia de proteínas SOCS está implicada en la generación de células Th, y en particular SOCS1 controla la polarización de células T CD4 a los linajes Th1 y Th2, afectando también a la maduración y función de células T CD8¹⁴⁹. En un estudio reciente, Johnson y colaboradores demuestran que un péptido derivado de la región KIR de SOCS1 regula las respuestas Th1 y Th17 en un modelo experimental de encefalomiелitis alérgica¹⁷⁶. Nuestros estudios de expresión génica en muestras de bazo demostraron que el péptido SOCS1 interfiere en la regulación de la respuesta inmune adaptativa, en concreto suprimiendo la expresión de citoquinas proinflamatorias características de la respuesta Th1 (IFN γ , IL-12 y TNF α), sin afectar los genes antiinflamatorios Th2 (IL-4 e IL-10). Esto concuerda perfectamente con los resultados de la terapia génica experimental en ratones ateroscleróticos, en los que observamos que el adenovirus de SOCS1 reducía los niveles sistémicos de las citoquinas IFN γ e IL-17 y aumentaba la expresión de Foxp3, sin alterar de forma significativa la expresión de IL-4.

De forma complementaria, el análisis por citometría de flujo de la expresión diferencial del marcador de monocitos murinos Ly6C mostró que la terapia con el péptido mimético de SOCS1, análogamente a lo observado en los estudios de terapia génica, reducía la cantidad relativa de monocitos circulantes CD115+Ly6C^{alto} (el equivalente al subtipo clásico CD14⁺⁺CD16⁻ en humanos). Estudios previos describen que los monocitos clásicos Ly6C^{alto} expresan niveles elevados de CCR2 y bajos de CX3CR1, presentan propiedades *scavenger* y son los principales productores de citoquinas inflamatorias como TNF α e IL-1 β ²¹². Además, son estos monocitos Ly6C^{alto} los que preferentemente interaccionan con el endotelio activado de los ratones ateroscleróticos e infiltran la placa de ateroma en desarrollo, donde se diferencian principalmente a macrófagos (algunos pueden adquirir fenotipo de célula dendrítica) y se convierten en células espumosas, participando de forma activa en la progresión y ruptura de la placa²¹³. Por su parte, los monocitos Ly6C^{bajo} (equivalente al subtipo no clásico CD14⁻CD16⁺⁺ en humanos) expresan niveles elevados de CX3CR1 y bajos de CCR2, no son capaces de expandirse, se infiltran en las lesiones con menor frecuencia que los monocitos Ly6C^{alto}, exhiben funciones fagocíticas y proangiogénicas y pueden madurar de

manera preferencial a células dendríticas¹⁶⁰. Por tanto, nuestros resultados sugieren que la regulación de la inflamación sistémica mediada por citoquinas Th1, así como la reducción del estado de activación de los monocitos circulantes y su reclutamiento diferencial hacia el sitio de la lesión, pueden explicar, al menos en parte, el efecto protector *in vivo* de la terapia basada en la proteína SOCS1 en los modelos experimentales.

A la vista de los resultados obtenidos en este trabajo, sugerimos que la terapia basada en el péptido mimético de SOCS1 resuelve algunas de las limitaciones clínicas que presentaba la terapia génica con adenovirus, siendo por tanto un abordaje más efectivo para frenar la aterosclerosis y la nefropatía diabética. Mientras que el tratamiento con adenovirus tuvo un papel principalmente preventivo en el desarrollo de la placa de ateroma, la administración del péptido de SOCS1 mostró además un interesante efecto terapéutico. Además, la vía de administración intraperitoneal del péptido mimético es efectiva, ya que se ha visto que alcanza todos los tejidos diana sin necesidad de inyecciones locales. Igualmente se ha observado que la administración repetida del péptido de SOCS1 a la dosis empleada no causa efectos nocivos en los animales tratados. No obstante, son necesarios futuros estudios para mejorar las características de este péptido sintético derivado de SOCS1 en vistas a una posible aplicación clínica: a) optimización de la secuencia peptídica que le confiera una mayor estabilidad a la degradación por proteasas; b) alternativas en la vía de administración, con posibilidad de suministrarse por vía oral u oftálmica; c) estudios de tratamiento combinado con otros fármacos, por ejemplo estatinas, IECA o ARA II para evaluar su posible efecto sinérgico frente a enfermedades cardiovasculares, hipertensión o diabetes.

En resumen, el presente estudio experimental demuestra que el péptido SOCS1 es capaz de inhibir las respuestas inflamatorias mediadas por JAK/STAT en ratones diabéticos, reduciendo así el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis y la nefropatía asociadas a diabetes (**Figura 68**). Por ello, sugerimos que la terapia basada en la funcionalidad de la proteína reguladora SOCS1 para inhibir las respuestas biológicas dependientes de JAK/STAT podría ser una potencial diana terapéutica en las complicaciones inflamatorias de la diabetes.

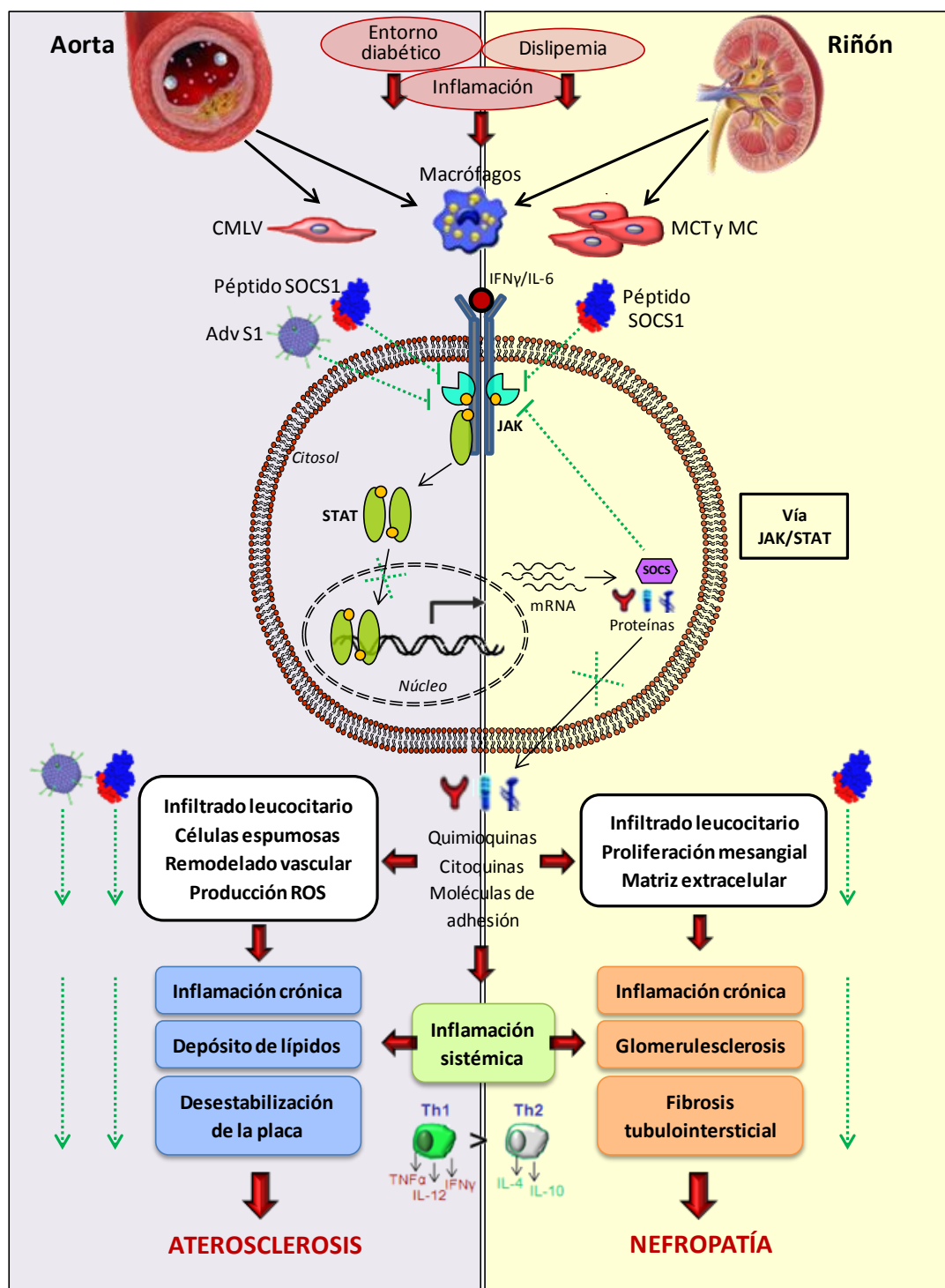


Figura 68. Mecanismos de acción de la vía JAK/STAT implicados en la patogenia del daño vascular y renal durante la diabetes y su modulación por las terapias basadas en SOCS1. La exposición a los diversos factores que constituyen el entorno diabético induce, en parte a través de la vía JAK/STAT, la expresión de mediadores que alteran la funcionalidad de las células vasculares y renales, lo que acelera el desarrollo de aterosclerosis y nefropatía. El tratamiento experimental con SOCS1 (terapia génica y péptido mimético) suprime la activación patológica de STAT y la expresión de sus genes diana, reduciendo así la inflamación sistémica y local, la aterosclerosis y el daño renal asociados a la diabetes.

VI. Conclusiones/ Conclusions

1. La terapia génica con la proteína reguladora SOCS1 como alternativa terapéutica en la aterosclerosis.

1.1. *In vitro*, la transferencia del gen SOCS1 mediante adenovirus recombinantes suprimió la activación de STAT1 y STAT3 y redujo la expresión de genes inflamatorios y la proliferación de células de músculo liso vascular y macrófagos estimulados con citoquinas.

1.2. En el modelo experimental de aterosclerosis, la expresión *in vivo* del transgen SOCS1 inhibió la activación de STAT1 y STAT3 en la aorta, redujo el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en la fase inicial y frenó la progresión de las lesiones avanzadas.

1.3. La terapia génica con SOCS1 promovió un fenotipo de placa más estable, caracterizado por un menor contenido de lípidos, linfocitos T y macrófagos proinflamatorios M1 y un mayor contenido de colágeno y macrófagos antiinflamatorios M2.

1.4. El tratamiento con adenovirus de SOCS1 redujo la expresión de genes proinflamatorios y proaterogénicos (citoquinas, quimioquinas, receptores de quimioquinas, moléculas de adhesión y receptores *scavenger*) en las lesiones ateroscleróticas y atenuó la inflamación sistémica (menor expresión de citoquinas Th1 y Th17 y aumento de genes Treg) y el estado de activación de los monocitos circulantes (proporción Ly6C^{alto} vs Ly6C^{bajo}).

2. Desarrollo de un péptido mimético de la proteína SOCS1 para el tratamiento de las complicaciones crónicas de la diabetes.

2.1. En cultivos de células vasculares y renales murinas, la internalización del péptido SOCS1, pero no su control estructural mutante, previno la activación de STAT1 y STAT3 y la expresión de genes relacionados con inflamación, fibrosis y estrés oxidativo, inhibiendo en consecuencia los procesos de proliferación, migración y adhesión celular.

2.2. El tratamiento experimental con el péptido mimético de SOCS1 previno el desarrollo de aterosclerosis acelerada por diabetes, reduciendo significativamente el tamaño, extensión y contenido lipídico de las placas de ateroma en diferentes fases de desarrollo de la lesión aterosclerótica, sin alterar los niveles de hiperglucemia ni el perfil lipídico de los ratones diabéticos.

2.3. El péptido SOCS1 suprimió la activación de STAT1 y STAT3 en las lesiones ateroscleróticas, redujo su componente inflamatorio (macrófagos, linfocitos T, citoquinas y quimioquinas) y aumentó los parámetros de estabilidad (colágeno y células de músculo liso vascular). El péptido SOCS1 también inhibió el estrés oxidativo en la vasculatura, reduciendo

la generación de ROS, la actividad enzimática de la NADPH oxidasa y la expresión de las subunidades Nox.

2.4. El tratamiento con el péptido SOCS1 mejoró la función renal de los ratones diabéticos y limitó la progresión de las lesiones renales (expansión mesangial, fibrosis e infiltrado leucocitario), un efecto asociado a la inhibición renal de STAT y a la expresión de genes relacionados con inflamación, daño tubular y fibrosis.

2.5. A nivel sistémico, el péptido SOCS1 atenuó las citoquinas de respuesta Th1 y el estado de activación de los monocitos circulantes en los ratones diabéticos.

En conclusión, los estudios presentados en esta tesis ayudan a conocer mejor los mecanismos inflamatorios implicados en el desarrollo y progresión de la aterosclerosis y la nefropatía diabética y proporcionan las bases para el desarrollo racional de nuevas terapias aplicables a las complicaciones de la diabetes, una enfermedad de gran impacto clínico y cuyo coste económico continúa en alza a pesar de las mejoras en su tratamiento. Proponemos, por tanto, que la modulación basada en la inhibición de la vía JAK/STAT mediante la sobreexpresión de la proteína SOCS1 o con el péptido sintético mimético de SOCS1, podría ser un interesante abordaje terapéutico en estas patologías.

1. Gene delivery of SOCS1 as a therapeutic option in atherosclerosis.

1.1. *In vitro*, adenovirus-mediated SOCS1 gene delivery suppressed STAT1 and STAT3 activation, thereby reducing inflammatory gene expression and cell proliferation in cytokine-stimulated vascular smooth muscle cells and macrophages.

1.2. In experimental atherosclerosis, SOCS1 transgene expression inhibited activation of STAT1 and STAT3 in aorta, reduced atherosclerotic lesion size at initial stages, and restrained the progression of advanced lesions.

1.3. SOCS1 gene therapy promoted a more stable plaque phenotype characterized by lower content of lipids, T lymphocytes and proinflammatory M1 macrophages, and higher content of antiinflammatory M2 macrophages and collagen.

1.4. SOCS1 adenovirus treatment diminished the expression of proinflammatory and proatherogenic genes (cytokines, chemokines and their receptors, adhesion molecules and scavenger receptors) in atherosclerotic lesions and attenuated systemic inflammation (lower Th1 and Th17 cytokines and higher Treg gens) and the activation state of circulating monocytes (Ly6C^{high} vs Ly6C^{low} ratio).

2. Development of a SOCS1 mimetic peptide for the treatment of chronic diabetic complications.

2.1. In cultured murine vascular and renal cells, internalization of SOCS1 peptide, but not the mutant sequence, prevented STAT1 and STAT3 activation and the expression of genes related to inflammation, fibrosis and oxidative stress, thereby reducing cell proliferation, migration and adhesion processes.

2.2. Experimental treatment with SOCS1 mimetic peptide prevented the development of diabetes-accelerated atherosclerosis by significantly decreasing the size, extension and lipid content of atheroma plaques at different stages of atherogenesis, without any influence on hyperglycemia and lipid profile of diabetic mice.

2.3. SOCS1 peptide suppressed both STAT1 and STAT3 activation in atherosclerotic lesions, reduced inflammatory component (macrophages, T lymphocytes, cytokines and chemokines) and increased plaque stability parameters (collagen and vascular smooth muscle cells content). SOCS1 peptide also attenuated vascular oxidative stress by decreasing ROS generation, NADPH oxidase activity and Nox subunit gene expression.

2.4. SOCS1-derived peptide therapy improved renal function in diabetic mice and limited the progression of kidney lesions (mesangial expansion, fibrosis and leukocyte infiltration) through the inhibition of renal STAT and the expression of genes involved in inflammation, tubular damage, and fibrosis.

2.5. Systemically, SOCS1 peptide inhibited proinflammatory Th1 cytokine expression and attenuated the activation state of circulating monocytes.

In summary, the results presented in this thesis allow to better understand the inflammatory mechanisms that underlie development and progression of atherosclerosis and diabetic nephropathy. We also provide the basis to establish new therapeutic approaches to vascular complications of diabetes, which is a very high clinic impact disease and whose economic cost is growing up in spite of recent treatment advances. Therefore, we propose JAK/STAT pathway inhibition through adenovirus-mediated SOCS1 gene delivery or SOCS1 mimetic peptide treatment as interesting therapeutic approaches for these pathologies.

VII. Bibliografía

- (1) Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2014 January;37 Suppl 1:S81-S90.
- (2) Scully T. Diabetes in numbers. *Nature* 2012 May 17;485(7398):S2-S3.
- (3) Leon BM, Maddox TM. Diabetes and cardiovascular disease: Epidemiology, biological mechanisms, treatment recommendations and future research. *World J Diabetes* 2015 October 10;6(13):1246-58.
- (4) Forbes JM, Cooper ME. Mechanisms of diabetic complications. *Physiol Rev* 2013 January;93(1):137-88.
- (5) Rask-Madsen C, King GL. Vascular complications of diabetes: mechanisms of injury and protective factors. *Cell Metab* 2013 January 8;17(1):20-33.
- (6) Libby P, Ridker PM, Hansson GK. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature* 2011 May 19;473(7347):317-25.
- (7) Hansson GK, Hermansson A. The immune system in atherosclerosis. *Nat Immunol* 2011 March;12(3):204-12.
- (8) Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002 December 19;420(6917):868-74.
- (9) Libby P, Theroux P. Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation* 2005 June 28;111(25):3481-8.
- (10) Abraham Kierszenbaum, Laura Tres. *Histology and Cell Biology: An Introduction to Pathology*. 2007.
- (11) Lafont A. Basic aspects of plaque vulnerability. *Heart* 2003 October;89(10):1262-7.
- (12) Johnson JL. Emerging regulators of vascular smooth muscle cell function in the development and progression of atherosclerosis. *Cardiovasc Res* 2014 September 1;103(4):452-60.
- (13) Fuster V, Moreno PR, Fayad ZA, Corti R, Badimon JJ. Atherothrombosis and high-risk plaque: part I: evolving concepts. *J Am Coll Cardiol* 2005 September 20;46(6):937-54.
- (14) Rafieian-Kopaei M, Setorki M, Doudi M, Baradaran A, Nasri H. Atherosclerosis: process, indicators, risk factors and new hopes. *Int J Prev Med* 2014 August;5(8):927-46.
- (15) Altabas V. Diabetes, Endothelial Dysfunction, and Vascular Repair: What Should a Diabetologist Keep His Eye on? *Int J Endocrinol* 2015;2015:848272.
- (16) Paneni F, Beckman JA, Creager MA, Cosentino F. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J* 2013 August;34(31):2436-43.

- (17) Harja E, Bu DX, Hudson BI, Chang JS, Shen X, Hallam K, Kalea AZ, Lu Y, Rosario RH, Oruganti S, Nikolla Z, Belov D, Lalla E, Ramasamy R, Yan SF, Schmidt AM. Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *J Clin Invest* 2008 January;118(1):183-94.
- (18) Srivastava AK. High glucose-induced activation of protein kinase signaling pathways in vascular smooth muscle cells: a potential role in the pathogenesis of vascular dysfunction in diabetes (review). *Int J Mol Med* 2002 January;9(1):85-9.
- (19) Kannel WB. Lipids, diabetes, and coronary heart disease: insights from the Framingham Study. *Am Heart J* 1985 November;110(5):1100-7.
- (20) Solano MP, Goldberg RB. Management of dyslipidemia in diabetes. *Cardiol Rev* 2006 May;14(3):125-35.
- (21) Chahil TJ, Ginsberg HN. Diabetic dyslipidemia. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2006 September;35(3):491-viii.
- (22) Manduteanu I, Simionescu M. Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders? *J Cell Mol Med* 2012 September;16(9):1978-90.
- (23) Ilhan F, Kalkanli ST. Atherosclerosis and the role of immune cells. *World J Clin Cases* 2015 April 16;3(4):345-52.
- (24) Smith JD, Trogan E, Ginsberg M, Grigaux C, Tian J, Miyata M. Decreased atherosclerosis in mice deficient in both macrophage colony-stimulating factor (op) and apolipoprotein E. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995 August 29;92(18):8264-8.
- (25) Sessa R, Pietro MD, Filardo S, Turriziani O. Infectious burden and atherosclerosis: A clinical issue. *World J Clin Cases* 2014 July 16;2(7):240-9.
- (26) Hulsmans M, Holvoet P. The vicious circle between oxidative stress and inflammation in atherosclerosis. *J Cell Mol Med* 2010 January;14(1-2):70-8.
- (27) De PF, Staels B, Chinetti-Gbaguidi G. Macrophage phenotypes and their modulation in atherosclerosis. *Circ J* 2014;78(8):1775-81.
- (28) Chinetti-Gbaguidi G, Baron M, Bouhlef MA, Vanhoutte J, Copin C, Sebti Y, Derudas B, Mayi T, Bories G, Tailleux A, Haulon S, Zawadzki C, Jude B, Staels B. Human atherosclerotic plaque alternative macrophages display low cholesterol handling but high phagocytosis because of distinct activities of the PPARgamma and LXRA pathways. *Circ Res* 2011 April 15;108(8):985-95.
- (29) Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2005 December;5(12):953-64.
- (30) Sica A, Erreni M, Allavena P, Porta C. Macrophage polarization in pathology. *Cell Mol Life Sci* 2015 November;72(21):4111-26.

- (31) Moore KJ, Tabas I. Macrophages in the pathogenesis of atherosclerosis. *Cell* 2011 April 29;145(3):341-55.
- (32) Newby AC, George SJ, Ismail Y, Johnson JL, Sala-Newby GB, Thomas AC. Vulnerable atherosclerotic plaque metalloproteinases and foam cell phenotypes. *Thromb Haemost* 2009 June;101(6):1006-11.
- (33) Van Vre EA, Van B, I, Bosmans JM, Vrints CJ, Bult H. Dendritic cells in human atherosclerosis: from circulation to atherosclerotic plaques. *Mediators Inflamm* 2011;2011:941396.
- (34) Ketelhuth DF, Hansson GK. Cellular immunity, low-density lipoprotein and atherosclerosis: break of tolerance in the artery wall. *Thromb Haemost* 2011 November;106(5):779-86.
- (35) Gordon S, Martinez FO. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. *Immunity* 2010 May 28;32(5):593-604.
- (36) Mosser DM. The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 2003 February;73(2):209-12.
- (37) Lintermans LL, Stegeman CA, Heeringa P, Abdulahad WH. T cells in vascular inflammatory diseases. *Front Immunol* 2014;5:504.
- (38) Wigren M, Nilsson J, Kolbus D. Lymphocytes in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2012 October 9;413(19-20):1562-8.
- (39) Caligiuri G, Nicoletti A, Poirier B, Hansson GK. Protective immunity against atherosclerosis carried by B cells of hypercholesterolemic mice. *J Clin Invest* 2002 March;109(6):745-53.
- (40) Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *J Clin Invest* 2001 May;107(10):1255-62.
- (41) Tedgui A, Mallat Z. Cytokines in atherosclerosis: pathogenic and regulatory pathways. *Physiol Rev* 2006 April;86(2):515-81.
- (42) Kleemann R, Zadelaar S, Kooistra T. Cytokines and atherosclerosis: a comprehensive review of studies in mice. *Cardiovasc Res* 2008 August 1;79(3):360-76.
- (43) Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. *J Biol Chem* 2007 July 13;282(28):20059-63.
- (44) Schuett H, Luchtefeld M, Grothusen C, Grote K, Schieffer B. How much is too much? Interleukin-6 and its signalling in atherosclerosis. *Thromb Haemost* 2009 August;102(2):215-22.
- (45) Koenen RR, Weber C. Chemokines: established and novel targets in atherosclerosis. *EMBO Mol Med* 2011 December;3(12):713-25.

- (46) Jiang Y, Beller DI, Frenzl G, Graves DT. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol* 1992 April 15;148(8):2423-8.
- (47) Yla-Herttuala S, Lipton BA, Rosenfeld ME, Sarkioja T, Yoshimura T, Leonard EJ, Witztum JL, Steinberg D. Expression of monocyte chemoattractant protein 1 in macrophage-rich areas of human and rabbit atherosclerotic lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991 June 15;88(12):5252-6.
- (48) Mach F, Sauty A, Iarossi AS, Sukhova GK, Neote K, Libby P, Luster AD. Differential expression of three T lymphocyte-activating CXC chemokines by human atheroma-associated cells. *J Clin Invest* 1999 October;104(8):1041-50.
- (49) Braunersreuther V, Zernecke A, Arnaud C, Liehn EA, Steffens S, Shagdarsuren E, Bidzhekov K, Burger F, Pelli G, Luckow B, Mach F, Weber C. Ccr5 but not Ccr1 deficiency reduces development of diet-induced atherosclerosis in mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 February;27(2):373-9.
- (50) Husain K, Hernandez W, Ansari RA, Ferder L. Inflammation, oxidative stress and renin angiotensin system in atherosclerosis. *World J Biol Chem* 2015 August 26;6(3):209-17.
- (51) Jiang X, Zeng HS, Guo Y, Zhou ZB, Tang BS, Li FK. The expression of matrix metalloproteinases-9, transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta receptor I in human atherosclerotic plaque and their relationship with plaque stability. *Chin Med J (Engl)* 2004 December;117(12):1825-9.
- (52) Gustafsson S, Lind L, Soderberg S, Zilmer M, Hulthe J, Ingelsson E. Oxidative stress and inflammatory markers in relation to circulating levels of adiponectin. *Obesity (Silver Spring)* 2013 July;21(7):1467-73.
- (53) Heistad DD, Wakisaka Y, Miller J, Chu Y, Pena-Silva R. Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 2009 February;73(2):201-7.
- (54) Simionescu M. Implications of early structural-functional changes in the endothelium for vascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007 February;27(2):266-74.
- (55) Brandes RP, Weissmann N, Schroder K. NADPH oxidases in cardiovascular disease. *Free Radic Biol Med* 2010 September 1;49(5):687-706.
- (56) Lassegue B, Griendling KK. NADPH oxidases: functions and pathologies in the vasculature. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010 April;30(4):653-61.
- (57) Touyz RM, Briones AM, Sedeek M, Burger D, Montezano AC. NOX isoforms and reactive oxygen species in vascular health. *Mol Interv* 2011 February;11(1):27-35.
- (58) Manea A. NADPH oxidase-derived reactive oxygen species: involvement in vascular physiology and pathology. *Cell Tissue Res* 2010 December;342(3):325-39.

- (59) Ellmark SH, Dusting GJ, Fui MN, Guzzo-Pernell N, Drummond GR. The contribution of Nox4 to NADPH oxidase activity in mouse vascular smooth muscle. *Cardiovasc Res* 2005 February 1;65(2):495-504.
- (60) Geiszt M. NADPH oxidases: new kids on the block. *Cardiovasc Res* 2006 July 15;71(2):289-99.
- (61) Takeya R, Sumimoto H. Molecular mechanism for activation of superoxide-producing NADPH oxidases. *Mol Cells* 2003 December 31;16(3):271-7.
- (62) Bedard K, Krause KH. The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 2007 January;87(1):245-313.
- (63) Bentata Y, Haddiya I, Latrech H, Serraj K, Abouqal R. Progression of diabetic nephropathy, risk of end-stage renal disease and mortality in patients with type-1 diabetes. *Saudi J Kidney Dis Transpl* 2013 March;24(2):392-402.
- (64) Sustained effect of intensive treatment of type 1 diabetes mellitus on development and progression of diabetic nephropathy: the Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (EDIC) study. *JAMA* 2003 October 22;290(16):2159-67.
- (65) Mene P, Simonson MS, Dunn MJ. Physiology of the mesangial cell. *Physiol Rev* 1989 October;69(4):1347-424.
- (66) Ooi BS, Cohen DJ, Veis JH. Biology of the mesangial cell in glomerulonephritis--role of cytokines. *Proc Soc Exp Biol Med* 1996 December;213(3):230-7.
- (67) Duran-Salgado MB, Rubio-Guerra AF. Diabetic nephropathy and inflammation. *World J Diabetes* 2014 June 15;5(3):393-8.
- (68) Lim AK. Diabetic nephropathy - complications and treatment. *Int J Nephrol Renovasc Dis* 2014;7:361-81.
- (69) Fernandez-Fernandez B, Ortiz A, Gomez-Guerrero C, Egido J. Therapeutic approaches to diabetic nephropathy--beyond the RAS. *Nat Rev Nephrol* 2014 June;10(6):325-46.
- (70) Dronavalli S, Duka I, Bakris GL. The pathogenesis of diabetic nephropathy. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab* 2008 August;4(8):444-52.
- (71) Lim AK, Tesch GH. Inflammation in diabetic nephropathy. *Mediators Inflamm* 2012;2012:146154.
- (72) Wada J, Makino H. Inflammation and the pathogenesis of diabetic nephropathy. *Clin Sci (Lond)* 2013 February;124(3):139-52.
- (73) Tavafi M. Complexity of diabetic nephropathy pathogenesis and design of investigations. *J Renal Inj Prev* 2013;2(2):59-62.
- (74) Atchley DH, Lopes-Virella MF, Zheng D, Kenny D, Virella G. Oxidized LDL-anti-oxidized LDL immune complexes and diabetic nephropathy. *Diabetologia* 2002 November;45(11):1562-71.

- (75) Chen SC, Tseng CH. Dyslipidemia, kidney disease, and cardiovascular disease in diabetic patients. *Rev Diabet Stud* 2013;10(2-3):88-100.
- (76) Lassila M, Seah KK, Allen TJ, Thallas V, Thomas MC, Candido R, Burns WC, Forbes JM, Calkin AC, Cooper ME, Jandeleit-Dahm KA. Accelerated nephropathy in diabetic apolipoprotein e-knockout mouse: role of advanced glycation end products. *J Am Soc Nephrol* 2004 August;15(8):2125-38.
- (77) Navarro-Gonzalez JF, Mora-Fernandez C. The role of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2008 March;19(3):433-42.
- (78) Williams MD, Nadler JL. Inflammatory mechanisms of diabetic complications. *Curr Diab Rep* 2007 June;7(3):242-8.
- (79) Moriya R, Manivel JC, Mauer M. Juxtaglomerular apparatus T-cell infiltration affects glomerular structure in Type 1 diabetic patients. *Diabetologia* 2004 January;47(1):82-8.
- (80) Lopez-Parra V, Mallavia B, Lopez-Franco O, Ortiz-Munoz G, Oguiza A, Recio C, Blanco J, Nimmerjahn F, Egido J, Gomez-Guerrero C. Fcγ receptor deficiency attenuates diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2012 September;23(9):1518-27.
- (81) Abbott F, Ryan JJ, Ceska M, Matsushima K, Sarraf CE, Rees AJ. Interleukin-1 beta stimulates human mesangial cells to synthesize and release interleukins-6 and -8. *Kidney Int* 1991 October;40(4):597-605.
- (82) Horii Y, Iwano M, Hirata E, Shiiki M, Fujii Y, Dohi K, Ishikawa H. Role of interleukin-6 in the progression of mesangial proliferative glomerulonephritis. *Kidney Int Suppl* 1993 January;39:S71-S75.
- (83) Kayama F, Yoshida T, Kodama Y, Matsui T, Matheson JM, Luster MI. Pro-inflammatory cytokines and interleukin 6 in the renal response to bacterial endotoxin. *Cytokine* 1997 September;9(9):688-95.
- (84) Coleman DL, Ruef C. Interleukin-6: an autocrine regulator of mesangial cell growth. *Kidney Int* 1992 March;41(3):604-6.
- (85) Shahbazian H, Rezaii I. Diabetic kidney disease; review of the current knowledge. *J Renal Inj Prev* 2013;2(2):73-80.
- (86) Roberts AB, Tian F, Byfield SD, Stuelten C, Ooshima A, Saika S, Flanders KC. Smad3 is key to TGF-beta-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, fibrosis, tumor suppression and metastasis. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006 February;17(1-2):19-27.
- (87) Liu Y. Renal fibrosis: new insights into the pathogenesis and therapeutics. *Kidney Int* 2006 January;69(2):213-7.
- (88) Ziyadeh FN. Mediators of diabetic renal disease: the case for tgf-Beta as the major mediator. *J Am Soc Nephrol* 2004 January;15 Suppl 1:S55-S57.

- (89) Pohlers D, Brenmoehl J, Loffler I, Muller CK, Leipner C, Schultze-Mosgau S, Stallmach A, Kinne RW, Wolf G. TGF-beta and fibrosis in different organs - molecular pathway imprints. *Biochim Biophys Acta* 2009 August;1792(8):746-56.
- (90) Shikata K, Makino H. Microinflammation in the pathogenesis of diabetic nephropathy. *J Diabetes Investig* 2013 March 18;4(2):142-9.
- (91) Ruster C, Wolf G. The role of chemokines and chemokine receptors in diabetic nephropathy. *Front Biosci* 2008;13:944-55.
- (92) Brosius FC, Khoury CC, Buller CL, Chen S. Abnormalities in signaling pathways in diabetic nephropathy. *Expert Rev Endocrinol Metab* 2010;5(1):51-64.
- (93) Brosius FC, III. New insights into the mechanisms of fibrosis and sclerosis in diabetic nephropathy. *Rev Endocr Metab Disord* 2008 December;9(4):245-54.
- (94) Mariappan MM. Signaling mechanisms in the regulation of renal matrix metabolism in diabetes. *Exp Diabetes Res* 2012;2012:749812.
- (95) Kanwar YS, Sun L, Xie P, Liu FY, Chen S. A glimpse of various pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *Annu Rev Pathol* 2011;6:395-423.
- (96) Schena FP, Gesualdo L. Pathogenetic mechanisms of diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2005 March;16 Suppl 1:S30-S33.
- (97) Ortiz-Munoz G, Martin-Ventura JL, Hernandez-Vargas P, Mallavia B, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Munoz-Garcia B, Fernandez-Vizarrá P, Ortega L, Egido J, Gomez-Guerrero C. Suppressors of cytokine signaling modulate JAK/STAT-mediated cell responses during atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 April;29(4):525-31.
- (98) Darnell JE, Jr. STATs and gene regulation. *Science* 1997 September 12;277(5332):1630-5.
- (99) Shuai K, Liu B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2003 November;3(11):900-11.
- (100) Kiu H, Nicholson SE. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors* 2012 April;30(2):88-106.
- (101) Pellegrini S, Dusanter-Fourt I. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs). *Eur J Biochem* 1997 September 15;248(3):615-33.
- (102) Miklossy G, Hilliard TS, Turkson J. Therapeutic modulators of STAT signalling for human diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2013 August;12(8):611-29.
- (103) Stark GR, Darnell JE, Jr. The JAK-STAT pathway at twenty. *Immunity* 2012 April 20;36(4):503-14.

- (104) Trengove MC, Ward AC. SOCS proteins in development and disease. *Am J Clin Exp Immunol* 2013;2(1):1-29.
- (105) Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. *Annu Rev Immunol* 1998;16:293-322.
- (106) Yoshimura A, Naka T, Kubo M. SOCS proteins, cytokine signalling and immune regulation. *Nat Rev Immunol* 2007 June;7(6):454-65.
- (107) Stark GR, Kerr IM, Williams BR, Silverman RH, Schreiber RD. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem* 1998;67:227-64.
- (108) Marrero MB, Banes-Berceli AK, Stern DM, Eaton DC. Role of the JAK/STAT signaling pathway in diabetic nephropathy. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006 April;290(4):F762-F768.
- (109) Mueller A, Strange PG. CCL3, acting via the chemokine receptor CCR5, leads to independent activation of Janus kinase 2 (JAK2) and Gi proteins. *FEBS Lett* 2004 July 16;570(1-3):126-32.
- (110) Ortiz-Munoz G, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Fernandez-Vizarra P, Mallavia B, Flores C, Sanz A, Blanco J, Mezzano S, Ortiz A, Egido J, Gomez-Guerrero C. Suppressors of cytokine signaling abrogate diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 2010 May;21(5):763-72.
- (111) Hernandez-Vargas P, Lopez-Franco O, Sanjuan G, Ruperez M, Ortiz-Munoz G, Suzuki Y, Aguado-Roncero P, Perez-Tejerizo G, Blanco J, Egido J, Ruiz-Ortega M, Gomez-Guerrero C. Suppressors of cytokine signaling regulate angiotensin II-activated Janus kinase-signal transducers and activators of transcription pathway in renal cells. *J Am Soc Nephrol* 2005 June;16(6):1673-83.
- (112) Larsen L, Ropke C. Suppressors of cytokine signalling: SOCS. *APMIS* 2002 December;110(12):833-44.
- (113) Starr R, Willson TA, Viney EM, Murray LJ, Rayner JR, Jenkins BJ, Gonda TJ, Alexander WS, Metcalf D, Nicola NA, Hilton DJ. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* 1997 June 26;387(6636):917-21.
- (114) Alexander WS. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002 June;2(6):410-6.
- (115) Endo TA, Masuhara M, Yokouchi M, Suzuki R, Sakamoto H, Mitsui K, Matsumoto A, Tanimura S, Ohtsubo M, Misawa H, Miyazaki T, Leonor N, Taniguchi T, Fujita T, Kanakura Y, Komiyama S, Yoshimura A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* 1997 June 26;387(6636):921-4.
- (116) Schmitz J, Weissenbach M, Haan S, Heinrich PC, Schaper F. SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* 2000 April 28;275(17):12848-56.

- (117) Kamura T, Sato S, Haque D, Liu L, Kaelin WG, Jr., Conaway RC, Conaway JW. The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev* 1998 December 15;12(24):3872-81.
- (118) Zhang JG, Metcalf D, Rakar S, Asimakis M, Greenhalgh CJ, Willson TA, Starr R, Nicholson SE, Carter W, Alexander WS, Hilton DJ, Nicola NA. The SOCS box of suppressor of cytokine signaling-1 is important for inhibition of cytokine action in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001 November 6;98(23):13261-5.
- (119) Shi Y, Zhang Y, Wang C, Du C, Zhao S, Qi Z, Zhang Q, Duan H. Suppressor of cytokine signaling-1 reduces high glucose-induced TGF-beta1 and fibronectin synthesis in human mesangial cells. *FEBS Lett* 2008 October 15;582(23-24):3484-8.
- (120) Calegari VC, Bezerra RM, Torsoni MA, Torsoni AS, Franchini KG, Saad MJ, Velloso LA. Suppressor of cytokine signaling 3 is induced by angiotensin II in heart and isolated cardiomyocytes, and participates in desensitization. *Endocrinology* 2003 October;144(10):4586-96.
- (121) Gomez-Guerrero C, Lopez-Franco O, Sanjuan G, Hernandez-Vargas P, Suzuki Y, Ortiz-Munoz G, Blanco J, Egido J. Suppressors of cytokine signaling regulate Fc receptor signaling and cell activation during immune renal injury. *J Immunol* 2004 June 1;172(11):6969-77.
- (122) Michaylira CZ, Simmons JG, Ramocki NM, Scull BP, McNaughton KK, Fuller CR, Lund PK. Suppressor of cytokine signaling-2 limits intestinal growth and enterotrophic actions of IGF-I in vivo. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2006 September;291(3):G472-G481.
- (123) Ivanenkov YA, Balakin KV, Tkachenko SE. New approaches to the treatment of inflammatory disease : focus on small-molecule inhibitors of signal transduction pathways. *Drugs R D* 2008;9(6):397-434.
- (124) West K. CP-690550, a JAK3 inhibitor as an immunosuppressant for the treatment of rheumatoid arthritis, transplant rejection, psoriasis and other immune-mediated disorders. *Curr Opin Investig Drugs* 2009 May;10(5):491-504.
- (125) de Prati AC, Ciampa AR, Cavalieri E, Zaffini R, Darra E, Menegazzi M, Suzuki H, Mariotto S. STAT1 as a new molecular target of anti-inflammatory treatment. *Curr Med Chem* 2005;12(16):1819-28.
- (126) Lim WS, Timmins JM, Seimon TA, Sadler A, Kolodgie FD, Virmani R, Tabas I. Signal transducer and activator of transcription-1 is critical for apoptosis in macrophages subjected to endoplasmic reticulum stress in vitro and in advanced atherosclerotic lesions in vivo. *Circulation* 2008 February 19;117(7):940-51.
- (127) Agrawal S, Febbraio M, Podrez E, Cathcart MK, Stark GR, Chisolm GM. Signal transducer and activator of transcription 1 is required for optimal foam cell formation and atherosclerotic lesion development. *Circulation* 2007 June 12;115(23):2939-47.

- (128) Gharavi NM, Alva JA, Mouillesseaux KP, Lai C, Yeh M, Yeung W, Johnson J, Szeto WL, Hong L, Fishbein M, Wei L, Pfeffer LM, Berliner JA. Role of the Jak/STAT pathway in the regulation of interleukin-8 transcription by oxidized phospholipids in vitro and in atherosclerosis in vivo. *J Biol Chem* 2007 October 26;282(43):31460-8.
- (129) Seki Y, Kai H, Shibata R, Nagata T, Yasukawa H, Yoshimura A, Imaizumi T. Role of the JAK/STAT pathway in rat carotid artery remodeling after vascular injury. *Circ Res* 2000 July 7;87(1):12-8.
- (130) Gomez-Guerrero C, Mallavia B, Egido J. Targeting inflammation in cardiovascular diseases. still a neglected field? *Cardiovasc Ther* 2012 August;30(4):e189-e197.
- (131) Berthier CC, Zhang H, Schin M, Henger A, Nelson RG, Yee B, Boucherot A, Neusser MA, Cohen CD, Carter-Su C, Argetsinger LS, Rastaldi MP, Brosius FC, Kretzler M. Enhanced expression of Janus kinase-signal transducer and activator of transcription pathway members in human diabetic nephropathy. *Diabetes* 2009 February;58(2):469-77.
- (132) Banes-Berceli AK, Shaw S, Ma G, Brands M, Eaton DC, Stern DM, Fulton D, Caldwell RW, Marrero MB. Effect of simvastatin on high glucose- and angiotensin II-induced activation of the JAK/STAT pathway in mesangial cells. *Am J Physiol Renal Physiol* 2006 July;291(1):F116-F121.
- (133) Shi YH, Zhao S, Wang C, Li Y, Duan HJ. Fluvastatin inhibits activation of JAK and STAT proteins in diabetic rat glomeruli and mesangial cells under high glucose conditions. *Acta Pharmacol Sin* 2007 December;28(12):1938-46.
- (134) Veenbergen S, Bennink MB, de Hooze AS, Arntz OJ, Smeets RL, van den Berg WB, van de Loo FA. Splenic suppressor of cytokine signaling 3 transgene expression affects T cell responses and prevents development of collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2008 December;58(12):3742-52.
- (135) Flodstrom-Tullberg M, Yadav D, Hagerkvist R, Tsai D, Secret P, Stotland A, Sarvetnick N. Target cell expression of suppressor of cytokine signaling-1 prevents diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* 2003 November;52(11):2696-700.
- (136) Shi Y, Du C, Zhang Y, Ren Y, Hao J, Zhao S, Yao F, Duan H. Suppressor of cytokine signaling-1 ameliorates expression of MCP-1 in diabetic nephropathy. *Am J Nephrol* 2010;31(5):380-8.
- (137) Grothusen C, Schuett H, Hillmer A, Lumpe S, Grote K, Ballmaier M, Bleich A, Glage S, Tietge UJ, Luchtefeld M, Schieffer B. Role of suppressor of cytokine signaling-1 in murine atherosclerosis. *PLoS One* 2012;7(12):e51608.
- (138) de AC, Martinez del PA, Mancheno JM, Onaderra M, Lacadena J, Martinez-Ruiz A, Perez-Canadillas JM, Bruix M, Gavilanes JG. Assignment of the contribution of the tryptophan residues to the spectroscopic and functional properties of the ribotoxin alpha-sarcin. *Proteins* 2000 November 15;41(3):350-61.
- (139) Mallavia B, Oguiza A, Lopez-Franco O, Recio C, Ortiz-Munoz G, Lazaro I, Lopez-Parra V, Egido J, Gomez-Guerrero C. Gene Deficiency in Activating Fcgamma Receptors Influences the Macrophage Phenotypic Balance and Reduces Atherosclerosis in Mice. *PLoS One* 2013;8(6):e66754.

- (140) Lopez-Franco O, Hernandez-Vargas P, Ortiz-Munoz G, Sanjuan G, Suzuki Y, Ortega L, Blanco J, Egido J, Gomez-Guerrero C. Parthenolide modulates the NF-kappaB-mediated inflammatory responses in experimental atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2006 August;26(8):1864-70.
- (141) Halvorsen B, Otterdal K, Dahl TB, Skjelland M, Gullestad L, Oie E, Aukrust P. Atherosclerotic plaque stability--what determines the fate of a plaque? *Prog Cardiovasc Dis* 2008 November;51(3):183-94.
- (142) Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys Acta* 2005 August 10;1751(2):119-39.
- (143) Ortiz-Munoz G, Mallavia B, Lopez-Franco O, Hernandez-Vargas P, Egido J, Gomez-Guerrero C. Renal delivery of adenovirus and antisense oligonucleotides in rats by retrograde renal vein injection. *Methods Mol Biol* 2012;886:321-9.
- (144) Oguiza A, Recio C, Lazaro I, Mallavia B, Blanco J, Egido J, Gomez-Guerrero C. Peptide-based inhibition of IkappaB kinase/nuclear factor-kappaB pathway protects against diabetes-associated nephropathy and atherosclerosis in a mouse model of type 1 diabetes. *Diabetologia* 2015 July;58(7):1656-67.
- (145) Tamiya T, Kashiwagi I, Takahashi R, Yasukawa H, Yoshimura A. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) proteins and JAK/STAT pathways: regulation of T-cell inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011 May;31(5):980-5.
- (146) White GE, Cotterill A, Addley MR, Soilleux EJ, Greaves DR. Suppressor of cytokine signalling protein SOCS3 expression is increased at sites of acute and chronic inflammation. *J Mol Histol* 2011 April;42(2):137-51.
- (147) Rastmanesh MM, Bluysen HA, Joles JA, Boer P, Willekes N, Braam B. Increased expression of SOCS3 in monocytes and SOCS1 in lymphocytes correlates with progressive loss of renal function and cardiovascular risk factors in chronic kidney disease. *Eur J Pharmacol* 2008 September 28;593(1-3):99-104.
- (148) Liang X, He M, Chen T, Liu Y, Tian YL, Wu YL, Zhao Y, Shen Y, Yuan ZY. Multiple roles of SOCS proteins: differential expression of SOCS1 and SOCS3 in atherosclerosis. *Int J Mol Med* 2013 May;31(5):1066-74.
- (149) Palmer DC, Restifo NP. Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. *Trends Immunol* 2009 December;30(12):592-602.
- (150) Sakurai H, Tashiro K, Kawabata K, Yamaguchi T, Sakurai F, Nakagawa S, Mizuguchi H. Adenoviral expression of suppressor of cytokine signaling-1 reduces adenovirus vector-induced innate immune responses. *J Immunol* 2008 April 1;180(7):4931-8.
- (151) Qin L, Huang Q, Zhang H, Liu R, Tellides G, Min W, Yu L. SOCS1 Prevents Graft Arteriosclerosis by Preserving Endothelial Cell Function. *J Am Coll Cardiol* 2013 August 14.

- (152) Tajiri K, Imanaka-Yoshida K, Matsubara A, Tsujimura Y, Hiroe M, Naka T, Shimojo N, Sakai S, Aonuma K, Yasutomi Y. Suppressor of cytokine signaling 1 DNA administration inhibits inflammatory and pathogenic responses in autoimmune myocarditis. *J Immunol* 2012 August 15;189(4):2043-53.
- (153) He C, Yu CR, Sun L, Mahdi RM, Larkin J, III, Egwuagu CE. Topical administration of a suppressor of cytokine signaling-1 (SOCS1) mimetic peptide inhibits ocular inflammation and mitigates ocular pathology during mouse uveitis. *J Autoimmun* 2015 August;62:31-8.
- (154) Amodio N, Bellizzi D, Leotta M, Raimondi L, Biamonte L, D'Aquila P, Di Martino MT, Calimeri T, Rossi M, Lionetti M, Leone E, Passarino G, Neri A, Giordano A, Tagliaferri P, Tassone P. miR-29b induces SOCS-1 expression by promoter demethylation and negatively regulates migration of multiple myeloma and endothelial cells. *Cell Cycle* 2013 December 1;12(23):3650-62.
- (155) Liu Q, Xing L, Wang L, Yao F, Liu S, Hao J, Liu W, Duan H. Therapeutic effects of suppressors of cytokine signaling in diabetic nephropathy. *J Histochem Cytochem* 2014 February;62(2):119-28.
- (156) Al-Saikhani FI. The gene therapy revolution in ophthalmology. *Saudi J Ophthalmol* 2013 April;27(2):107-11.
- (157) Maier P, von KC, Laufs S. Retroviral vectors for gene therapy. *Future Microbiol* 2010 October;5(10):1507-23.
- (158) Nienhuis AW. Development of gene therapy for blood disorders: an update. *Blood* 2013 August 29;122(9):1556-64.
- (159) Ait-Oufella H, Taleb S, Mallat Z, Tedgui A. Recent advances on the role of cytokines in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011 May;31(5):969-79.
- (160) Swirski FK, Weissleder R, Pittet MJ. Heterogeneous in vivo behavior of monocyte subsets in atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2009 October;29(10):1424-32.
- (161) Pello OM, Silvestre C, De PM, Andres V. A glimpse on the phenomenon of macrophage polarization during atherosclerosis. *Immunobiology* 2011 November;216(11):1172-6.
- (162) Kuchibhotla S, Vanegas D, Kennedy DJ, Guy E, Nimako G, Morton RE, Febbraio M. Absence of CD36 protects against atherosclerosis in ApoE knock-out mice with no additional protection provided by absence of scavenger receptor A I/II. *Cardiovasc Res* 2008 April 1;78(1):185-96.
- (163) Piechota M, Banaszewska A, Dudziak J, Slomczynski M, Plewa R. Highly upregulated expression of CD36 and MSR1 in circulating monocytes of patients with acute coronary syndromes. *Protein J* 2012 August;31(6):511-8.
- (164) Yu XH, Fu YC, Zhang DW, Yin K, Tang CK. Foam cells in atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 2013 September 23;424:245-52.
- (165) Douglas JT. Adenoviral vectors for gene therapy. *Mol Biotechnol* 2007 May;36(1):71-80.

- (166) Spencer MW, Muhlfeld AS, Segerer S, Hudkins KL, Kirk E, LeBoeuf RC, Alpers CE. Hyperglycemia and hyperlipidemia act synergistically to induce renal disease in LDL receptor-deficient BALB mice. *Am J Nephrol* 2004 January;24(1):20-31.
- (167) Wen M, Segerer S, Dantas M, Brown PA, Hudkins KL, Goodpaster T, Kirk E, LeBoeuf RC, Alpers CE. Renal injury in apolipoprotein E-deficient mice. *Lab Invest* 2002 August;82(8):999-1006.
- (168) Mallavia B, Recio C, Oguiza A, Ortiz-Munoz G, Lazaro I, Lopez-Parra V, Lopez-Franco O, Schindler S, Depping R, Egido J, Gomez-Guerrero C. Peptide inhibitor of NF-kappaB translocation ameliorates experimental atherosclerosis. *Am J Pathol* 2013 May;182(5):1910-21.
- (169) Di Bartolo BA, Nicholls SJ, Bao S, Rye KA, Heather AK, Barter PJ, Bursill C. The apolipoprotein A-I mimetic peptide ETC-642 exhibits anti-inflammatory properties that are comparable to high density lipoproteins. *Atherosclerosis* 2011 August;217(2):395-400.
- (170) Stoekenbroek RM, Stroes ES, Hovingh GK. ApoA-I mimetics. *Handb Exp Pharmacol* 2015;224:631-48.
- (171) Aluganti NC, Selvarajan K, Brown M, Parthasarathy S. Cationic peptides neutralize Ox-LDL, prevent its uptake by macrophages, and attenuate inflammatory response. *Atherosclerosis* 2014 September;236(1):133-41.
- (172) Smith JD. Apolipoprotein A-I and its mimetics for the treatment of atherosclerosis. *Curr Opin Investig Drugs* 2010 September;11(9):989-96.
- (173) Navab M, Anantharamaiah GM, Reddy ST, Fogelman AM. Apolipoprotein A-I mimetic peptides and their role in atherosclerosis prevention. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006 October;3(10):540-7.
- (174) Nicholson SE, De SD, Fabri LJ, Corbin J, Willson TA, Zhang JG, Silva A, Asimakis M, Farley A, Nash AD, Metcalf D, Hilton DJ, Nicola NA, Baca M. Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 June 6;97(12):6493-8.
- (175) Yasukawa H, Misawa H, Sakamoto H, Masuhara M, Sasaki A, Wakioka T, Ohtsuka S, Imaizumi T, Matsuda T, Ihle JN, Yoshimura A. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J* 1999 March 1;18(5):1309-20.
- (176) Ahmed CM, Larkin J, III, Johnson HM. SOCS1 Mimetics and Antagonists: A Complementary Approach to Positive and Negative Regulation of Immune Function. *Front Immunol* 2015;6:183.
- (177) Giordanetto F, Kroemer RT. A three-dimensional model of Suppressor Of Cytokine Signalling 1 (SOCS-1). *Protein Eng* 2003 February;16(2):115-24.
- (178) Tilstra J, Rehman KK, Hennon T, Plevy SE, Clemens P, Robbins PD. Protein transduction: identification, characterization and optimization. *Biochem Soc Trans* 2007 August;35(Pt 4):811-5.

- (179) Pfender NA, Grosch S, Roussel G, Koch M, Trifilieff E, Greer JM. Route of uptake of palmitoylated encephalitogenic peptides of myelin proteolipid protein by antigen-presenting cells: importance of the type of bond between lipid chain and peptide and relevance to autoimmunity. *J Immunol* 2008 February 1;180(3):1398-404.
- (180) Mujtaba MG, Flowers LO, Patel CB, Patel RA, Haider MI, Johnson HM. Treatment of mice with the suppressor of cytokine signaling-1 mimetic peptide, tyrosine kinase inhibitor peptide, prevents development of the acute form of experimental allergic encephalomyelitis and induces stable remission in the chronic relapsing/remitting form. *J Immunol* 2005 October 15;175(8):5077-86.
- (181) Waiboci LW, Ahmed CM, Mujtaba MG, Flowers LO, Martin JP, Haider MI, Johnson HM. Both the suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS-1) kinase inhibitory region and SOCS-1 mimetic bind to JAK2 autophosphorylation site: implications for the development of a SOCS-1 antagonist. *J Immunol* 2007 April 15;178(8):5058-68.
- (182) Jager LD, Dabelic R, Waiboci LW, Lau K, Haider MS, Ahmed CM, Larkin J, III, David S, Johnson HM. The kinase inhibitory region of SOCS-1 is sufficient to inhibit T-helper 17 and other immune functions in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2011 March;232(1-2):108-18.
- (183) Madonna S, Scarponi C, Doti N, Carbone T, Cavani A, Scognamiglio PL, Marasco D, Albanesi C. Therapeutical potential of a peptide mimicking the SOCS1 kinase inhibitory region in skin immune responses. *Eur J Immunol* 2013 July;43(7):1883-95.
- (184) Girolami EI, Bouhy D, Haber M, Johnson H, David S. Differential expression and potential role of SOCS1 and SOCS3 in Wallerian degeneration in injured peripheral nerve. *Exp Neurol* 2010 May;223(1):173-82.
- (185) Ahmed CM, Dabelic R, Waiboci LW, Jager LD, Heron LL, Johnson HM. SOCS-1 mimetics protect mice against lethal poxvirus infection: identification of a novel endogenous antiviral system. *J Virol* 2009 February;83(3):1402-15.
- (186) Ronn SG, Billestrup N, Mandrup-Poulsen T. Diabetes and suppressors of cytokine signaling proteins. *Diabetes* 2007 February;56(2):541-8.
- (187) Suchy D, Labuzek K, Machnik G, Kozlowski M, Okopien B. SOCS and diabetes--ups and downs of a turbulent relationship. *Cell Biochem Funct* 2013 April;31(3):181-95.
- (188) Krebs DL, Hilton DJ. A new role for SOCS in insulin action. Suppressor of cytokine signaling. *Sci STKE* 2003 February 11;2003(169):E6.
- (189) Kawazoe Y, Naka T, Fujimoto M, Kohzaki H, Morita Y, Narazaki M, Okumura K, Saitoh H, Nakagawa R, Uchiyama Y, Akira S, Kishimoto T. Signal transducer and activator of transcription (STAT)-induced STAT inhibitor 1 (SSI-1)/suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) inhibits insulin signal transduction pathway through modulating insulin receptor substrate 1 (IRS-1) phosphorylation. *J Exp Med* 2001 January 15;193(2):263-9.

- (190) Chong MM, Chen Y, Darwiche R, Dudek NL, Irawaty W, Santamaria P, Allison J, Kay TW, Thomas HE. Suppressor of cytokine signaling-1 overexpression protects pancreatic beta cells from CD8+ T cell-mediated autoimmune destruction. *J Immunol* 2004 May 1;172(9):5714-21.
- (191) McNelis JC, Olefsky JM. Macrophages, immunity, and metabolic disease. *Immunity* 2014 July 17;41(1):36-48.
- (192) Springall R, Amezcua-Guerra LM, Gonzalez-Pacheco H, Furuzawa-Carballeda J, Gomez-Garcia L, Marquez-Velasco R, Mejia-Dominguez AM, Cossio-Aranda J, Martinez-Sanchez C, Bojalil R. Interferon-gamma increases the ratio of matrix metalloproteinase-9/tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in peripheral monocytes from patients with coronary artery disease. *PLoS One* 2013;8(8):e72291.
- (193) Meng L, Park J, Cai Q, Lanting L, Reddy MA, Natarajan R. Diabetic conditions promote binding of monocytes to vascular smooth muscle cells and their subsequent differentiation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2010 March;298(3):H736-H745.
- (194) Nareika A, Sundararaj KP, Im YB, Game BA, Lopes-Virella MF, Huang Y. High glucose and interferon gamma synergistically stimulate MMP-1 expression in U937 macrophages by increasing transcription factor STAT1 activity. *Atherosclerosis* 2009 February;202(2):363-71.
- (195) Garcia-Garcia PM, Getino-Melian MA, Dominguez-Pimentel V, Navarro-Gonzalez JF. Inflammation in diabetic kidney disease. *World J Diabetes* 2014 August 15;5(4):431-43.
- (196) Agrawal NK, Kant S. Targeting inflammation in diabetes: Newer therapeutic options. *World J Diabetes* 2014 October 15;5(5):697-710.
- (197) Nilsson J, Bengtsson E, Fredrikson GN, Bjorkbacka H. Inflammation and immunity in diabetic vascular complications. *Curr Opin Lipidol* 2008 October;19(5):519-24.
- (198) Libby P, Okamoto Y, Rocha VZ, Folco E. Inflammation in atherosclerosis: transition from theory to practice. *Circ J* 2010 February;74(2):213-20.
- (199) Nguyen D, Ping F, Mu W, Hill P, Atkins RC, Chadban SJ. Macrophage accumulation in human progressive diabetic nephropathy. *Nephrology (Carlton)* 2006 June;11(3):226-31.
- (200) Shi JG, Chen X, Lee F, Emm T, Scherle PA, Lo Y, Punwani N, Williams WV, Yeleswaram S. The pharmacokinetics, pharmacodynamics, and safety of baricitinib, an oral JAK 1/2 inhibitor, in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 2014 December;54(12):1354-61.
- (201) Namour F, Diderichsen PM, Cox E, Vayssiere B, Van der Aa A, Tasset C, Van't Klooster G. Pharmacokinetics and Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Modeling of Filgotinib (GLPG0634), a Selective JAK1 Inhibitor, in Support of Phase IIB Dose Selection. *Clin Pharmacokinet* 2015 August;54(8):859-74.
- (202) Park JS, Lee J, Lim MA, Kim EK, Kim SM, Ryu JG, Lee JH, Kwok SK, Park KS, Kim HY, Park SH, Cho ML. JAK2-STAT3 blockade by AG490 suppresses autoimmune arthritis in mice via reciprocal regulation of regulatory T Cells and Th17 cells. *J Immunol* 2014 May 1;192(9):4417-24.

- (203) Sikorski K, Czerwoniec A, Bujnicki JM, Wesoly J, Bluysen HA. STAT1 as a novel therapeutical target in pro-atherogenic signal integration of IFN γ , TLR4 and IL-6 in vascular disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2011 August;22(4):211-9.
- (204) Tian S, Chen SY. Macrophage polarization in kidney diseases. *Macrophage (Houst)* 2015;2(1).
- (205) Karihaloo A. Anti-fibrosis therapy and diabetic nephropathy. *Curr Diab Rep* 2012 August;12(4):414-22.
- (206) Srivastava SP, Koya D, Kanasaki K. MicroRNAs in kidney fibrosis and diabetic nephropathy: roles on EMT and EndMT. *Biomed Res Int* 2013;2013:125469.
- (207) Giacco F, Brownlee M. Oxidative stress and diabetic complications. *Circ Res* 2010 October 29;107(9):1058-70.
- (208) Ceriello A. Controlling oxidative stress as a novel molecular approach to protecting the vascular wall in diabetes. *Curr Opin Lipidol* 2006 October;17(5):510-8.
- (209) Fenyo IM, Florea IC, Raicu M, Manea A. Tyrphostin AG490 reduces NADPH oxidase activity and expression in the aorta of hypercholesterolemic apolipoprotein E-deficient mice. *Vascul Pharmacol* 2011 March;54(3-6):100-6.
- (210) Xie JJ, Wang J, Tang TT, Chen J, Gao XL, Yuan J, Zhou ZH, Liao MY, Yao R, Yu X, Wang D, Cheng Y, Liao YH, Cheng X. The Th17/Treg functional imbalance during atherogenesis in ApoE(-/-) mice. *Cytokine* 2010 February;49(2):185-93.
- (211) Weber C, Noels H. Atherosclerosis: current pathogenesis and therapeutic options. *Nat Med* 2011;17(11):1410-22.
- (212) Stansfield BK, Ingram DA. Clinical significance of monocyte heterogeneity. *Clin Transl Med* 2015;4:5.
- (213) Swirski FK, Libby P, Aikawa E, Alcaide P, Luscinskas FW, Weissleder R, Pittet MJ. Ly-6Chi monocytes dominate hypercholesterolemia-associated monocytosis and give rise to macrophages in atheromata. *J Clin Invest* 2007 January;117(1):195-205.